

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Клеточное микроокружение
и таргетная терапия
злокачественных новообразований*

*Трансглутаминаза 2 и баланс
между аутофагией и апоптозом
в опухолевых клетках*

*Цитокератины при злокачественных
новообразованиях*

*Гены морфологически неизменного
эпителия прямой
кишки в диагностике патологии
толстой кишки*

*Молекулярный профиль вируса
Эпштейна–Барр у представителей
четырех этносов России*

ТОМ 10 № 4
2023

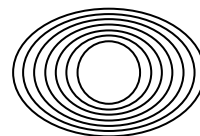


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

4 ^{ТОМ 10}
'23

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

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

www.abvpress.ru

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

или по адресу
adv.mol.onc@ronc.ru

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

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

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

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

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

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

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

ISSN 2313-805X (Print)
ISSN 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2023. Том 10. № 4. 1–156.

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

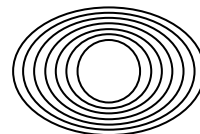
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

4 VOL. 10
'23

Founders:

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

Editorial Office:

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

Article submission:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2023. Vol. 10 No. 4. 1–156.

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

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

1000 copies.

Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

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

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

- Е.Ю. Зяблицкая, А.В. Кубышкин, Л.Е. Сорокина, А.В. Серебрякова, К.А. Алиев, П.Е. Максимова, А.Э. Лазарев, А.И. Балакчина, И.О. Головкин*
Клеточное микроокружение как объект таргетной терапии злокачественных новообразований 8
- Р.Н. Мустафин*
Взаимосвязь транспозонов с длинными некодирующими РНК и пептидами в канцерогенезе 21
- Ю.А. Гненная, О.М. Семёнов, Н.А. Барлев*
Роль транслгутаминазы 2 в регуляции баланса между аутофагией и апоптозом в опухолевых клетках 31
- Н.Н. Бабышкина, И.А. Узянбаев, Т.А. Дронова, Н.В. Чердынцева*
Интеграция сигнальных каскадов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$): роль в реализации терапевтической неэффективности тамоксифена 47
- Н.Н. Мазуренко, В.В. Югай, И.В. Цыганова*
Молекулярные особенности гастроинтестинальных стромальных опухолей «дикого типа» (KIT/PDGFR WT) 61
- М.А. Болдышевская, Л.А. Таширева, Е.С. Андрюхова, Т.А. Дронова, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер*
Неструктурная роль цитокератинов при злокачественных новообразованиях 76
- Ю.С. Милюткина, А.С. Сустретов, Л.В. Лимарева*
Молекулярно-генетические маркеры риска развития кардиотоксичности, индуцированной химиотерапией, у больных онкогематологическими заболеваниями: обзор литературы 86

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

- В.К. Боженко, С.В. Гончаров, М.В. Захаренко, Я.Ю. Киселева, Т.А. Кармакова, Т.М. Кулинич, У.С. Станоевич, Н.В. Мельникова, А.Л. Сенчукова, И.Б. Грунин, О.П. Близнюков, В.А. Солодкий*
Анализ экспрессии матричной РНК панели генов морфологически неизмененного эпителия прямой кишки как метод ранней диагностики патологии толстой кишки 97
- Д.В. Сорокин, О.Е. Андреева, А.М. Щербаков, Д.И. Сальникова, М.В. Гудкова, М.А. Красильников*
Феномен подавления эстрогенового сигналинга в клетках рака молочной железы под действием ультрафиолетового облучения: роль белков Snail 108
- К.В. Смирнова, А.К. Лубенская, Н.Б. Сенюта, Т.Е. Душенькина, В.Э. Гурцевич*
Молекулярный профиль вируса Эпштейна–Барр у представителей четырех этносов России: типы вируса, варибельность гена *LMP1* и злокачественные опухоли 116
- Н.А. Персиянцева, А.А. Калинина, М.А. Замкова, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский*
Характеристика эффекторов адаптивного иммунитета, вовлеченных во вторичный ксеногенный иммунный ответ на клетки меланомы человека 124
- В.Е. Шевченко, Н.Е. Арноцкая, Т.И. Кушнир, А.С. Брюховецкий*
Транскриптомный анализ нейральных стволовых и прогениторных клеток в сравнении со стволовыми клетками глиобластомы 137

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

- О.Е. Andreeva, D.V. Sorokin, S.V. Vinokurova, Yu. Yu Shchegolev, N.V. Elkina, A.N. Katargin, R.S. Faskhutdinov, D.I. Salnikova, A.M. Scherbakov, M.A. Krasil'nikov*
The effect of DNA methyltransferase 3A suppression in progression of the resistance phenotype in breast cancer cells 149

REVIEW

- E. Yu. Zyablitskaya, A. V. Kubyshkin, L. E. Sorokina, A. V. Serebryakova, K. A. Aliev, P. E. Maksimova, A. E. Lazarev, A. I. Balakchina, I. O. Golovkin*
Cellular microenvironment as an object of targeted therapy for malignant neoplasms 8
- R. N. Mustafin*
Relationship of transposable elements with long non-coding RNAs and peptides in carcinogenesis 21
- Yu. A. Gnennaya, O. M. Semenov, N. A. Barlev*
The role of transglutaminase 2 in regulation of the balance between autophagy and apoptosis in tumor cells 31
- N. N. Babyschkina, I. A. Uzryanbaev, T. A. Dronova, N. V. Cherdyntseva*
Integration of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling cascades: role in the therapeutic inefficiency of tamoxifen 47
- N. N. Mazurenko, V. V. Yugay, I. V. Tsyganova*
Molecular features of gastrointestinal stromal tumors “wild-type” (*KIT/PDGFR* WT) 61
- M. A. Boldyshevskaya, L. A. Tashireva, E. S. Andryukhova, T. A. Dronova, S. V. Vtorushin, V. M. Perelmuter*
Non-structural role of cytokeratins in malignant neoplasms 76
- Yu. S. Milyutkina, A. S. Sustretov, L. V. Limareva*
Molecular genetic markers of chemotherapy-induced cardiotoxicity in patients with oncohematological diseases (review) 86

EXPERIMENTAL REPORT

- V. C. Bozhenko, S. V. Goncharov, M. V. Zakharenko, Ya. Yu. Kiseleva, T. A. Karmakova, T. M. Kulinich, U. S. Stanoevich, N. V. Melnikova, A. L. Senchukova, I. B. Grunin, O. P. Bliznyukov, V. A. Solodky*
Analysis of the expression of matrix RNA of a panel of genes of morphologically unchanged rectal epithelium as a method of early diagnosis of colon pathology 97
- D. V. Sorokin, O. E. Andreeva, A. M. Scherbakov, D. I. Salnikova, M. V. Gudkova, M. A. Krasil'nikov*
Phenomenon of suppression of estrogen signaling in breast cancer cells under ultraviolet irradiation: role of Snail proteins 108
- K. V. Smirnova, A. K. Lubenskaya, N. B. Senyuta, T. E. Dushenkina, V. E. Gurtsevitch*
Molecular profile of Epstein–Barr virus in representatives of four ethnic groups of Russia: virus types, *LMP1* gene variability and malignancies 116
- N. A. Persiyantseva, A. A. Kalinina, M. A. Zamkova, L. M. Khromykh, D. B. Kazansky*
Characteristics of adaptive immune effectors involved in the secondary xenogeneic immune response to human melanoma cells 124
- V. E. Shevchenko, N. E. Arnotskaya, T. I. Kushnir, A. S. Bryukhovetskiy*
Transcriptomic analysis of neural stem and progenitor cells in comparison with glioblastoma stem cells 137

SHORT COMMUNICATION

- O. E. Andreeva, D. V. Sorokin, S. V. Vinokurova, Yu. Yu. Shchegolev, N. V. Elkina, A. N. Katargin, R. S. Faskhutdinov, D. I. Salnikova, A. M. Scherbakov, M. A. Krasil'nikov*
The effect of DNA methyltransferase 3A suppression in progression of the resistance phenotype in breast cancer cells 149

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20>

Клеточное микроокружение как объект таргетной терапии злокачественных новообразований

Е.Ю. Зяблицкая, А.В. Кубышкин, Л.Е. Сорокина, А.В. Серебрякова, К.А. Алиев, П.Е. Максимова, А.Э. Лазарев, А.И. Балакчина, И.О. Головкин

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»; Россия, 295051 Симферополь, бульвар Ленина, 5, стр. 7

Контакты: Евгения Юрьевна Зяблицкая evgu79@mail.ru

Динамические взаимоотношения между опухолевыми клетками и их микроокружением имеют решающее значение в развитии и прогрессировании злокачественного процесса. С учетом мультифункционального потенциала гетерогенных популяций, окружающих опухоль, нацеливание на компоненты микроокружения уже давно рассматривается как перспективная стратегия в современной терапии новообразований. В настоящем обзоре проанализированы роль компонентов клеточного микроокружения в канцерогенезе, а также пути и механизмы воздействия на основные популяции клеток, представляющие наибольший интерес в контексте разработки новых подходов к лечению злокачественных опухолей.

Ключевые слова: микроокружение опухоли, злокачественные новообразования, противоопухолевая терапия

Для цитирования: Зяблицкая Е.Ю., Кубышкин А.В., Сорокина Л.Е. и др. Клеточное микроокружение как объект таргетной терапии злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):8–20. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20>

Cellular microenvironment as an object of targeted therapy for malignant neoplasms

E. Yu. Zyablitskaya, A. V. Kubyshkin, L. E. Sorokina, A. V. Serebryakova, K. A. Aliev, P. E. Maksimova, A. E. Lazarev, A. I. Balakchina, I. O. Golovkin

S.I. Georgievsky Medical Academy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University; Bld. 7, 5 Lenin Boulevard, Simferopol 295051, Russia

Contacts: Evgenia Yurievna Zyablitskaya evgu79@mail.ru

The dynamic relationships between tumor cells and their microenvironment are of crucial importance in the development and progression of the malignant process. Given the multifunctional potential of heterogeneous populations surrounding a tumor, targeting components of the microenvironment has long been regarded as a promising strategy in modern anticancer therapy. This review discusses the role of the components of the cellular microenvironment in carcinogenesis, analyzes in detail the main ways and mechanisms of action on the main cell populations, which are of the greatest interest in the context of the development of innovative anticancer therapy.

Keywords: tumor microenvironment, malignant neoplasms, anticancer therapy

For citation: Zyablitskaya E. Yu., Kubyshkin A. V., Sorokina L. E. et al. Cellular microenvironment as an object of targeted therapy for malignant neoplasms. *Uspeshi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):8–20. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-8-20>

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы внимание ученых-фундаменталистов все больше приковано к клеточному составу микроокружения опухоли (tumor microenvironment, TME), которое обеспечивает регуляцию онкогенеза, оказывая непосредственное влияние на прогрессию, инвазию опухоли и активацию ангиогенеза [1]. Микроокружение опухоли представляет собой гетероген-

ную среду, содержащую клетки различного типа, в том числе стромальные фибробластического ряда, инфильтрирующие, эндотелиальные, ангиогенные, лимфоциты [2]. В формировании клеточного ландшафта, окружающего злокачественное новообразование (ЗНО), большая роль отводится внеклеточным сигнальным молекулам, ростовым факторам, хемокинам и цитокинам, выполняющим роль метаболических

регуляторов, обеспечивающих динамическое взаимодействие между клетками опухоли и ТМЕ. В процессе канцерогенеза опухолевые клетки приобретают агрессивный фенотип, дающий неограниченный пролиферативный и метастатический потенциалы, возможность ускользания от иммунного надзора и формирующий изменение сигнальной чувствительности [3] (рис. 1).

По мере своего роста опухоль оказывает дополнительное давление на структурные элементы стромы и приобретает возможность преодолевать жесткие компоненты внеклеточного матрикса (ECM), в то время как клетки ТМЕ, стремясь сохранить свою целостность, оказывают противодействующее влияние

на опухолевый массив [4]. Наряду с изменением физических свойств под влиянием опухолевых клеток ТМЕ постепенно перепрограммируется, обретая новые возможности: может проявлять как противоопухолевую, так и проопухолевую активность. Таким образом, взаимодействие опухолевых клеток и ТМЕ является сложным двунаправленным процессом.

Роль ТМЕ в динамическом регулировании прогрессирования рака и влиянии на его лекарственную устойчивость обуславливает активный интерес к клеточному составу среды для разработки новых таргетных противоопухолевых препаратов, нацеленных на стромальный и иммунный компоненты, а также

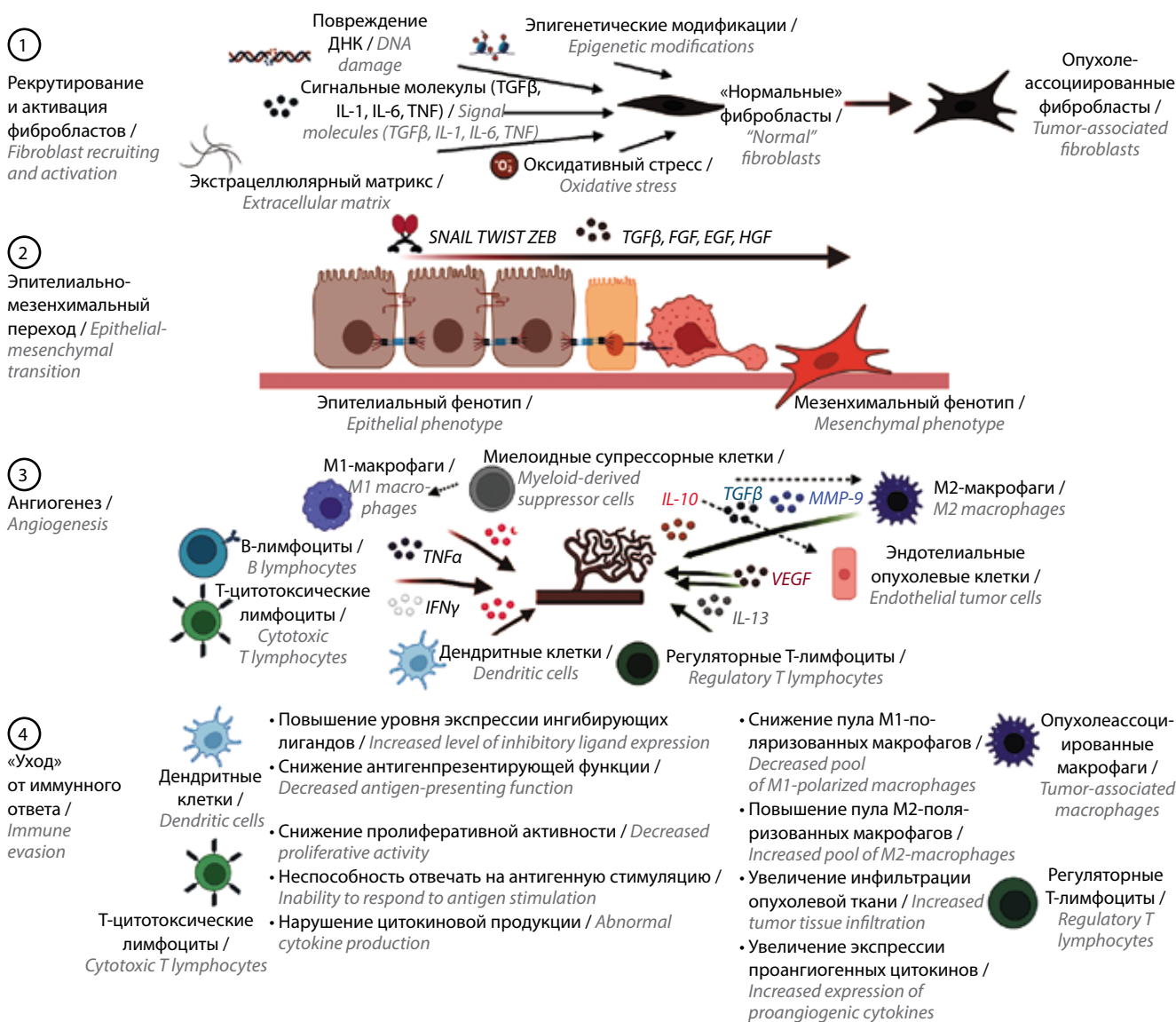


Рис. 1. Ключевые механизмы регуляции канцерогенеза. TGFβ – трансформирующий фактор роста β; IL-1 – интерлейкин-1; IL-6 – интерлейкин-6; IL-10 – интерлейкин-10; IL-13 – интерлейкин-13; TNF – фактор некроза опухоли; FGF – фактор роста фибробластов; EGF – эпидермальный фактор роста; HGF – фактор роста гепатоцитов; MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; IFNγ – интерферон γ

Fig. 1. Key mechanisms of carcinogenesis regulation. TGFβ – transforming growth factor β; IL-1 – interleukin-1; IL-6 – interleukin-6; IL-10 – interleukin-10; IL-13 – interleukin-13; TNF – tumor necrosis factor; FGF – fibroblast growth factor; EGF – epidermal growth factor; HGF – hepatocyte growth factor; MMP-9 – matrix metalloprotease 9; VEGF – vascular endothelial growth factor; IFNγ – interferon γ

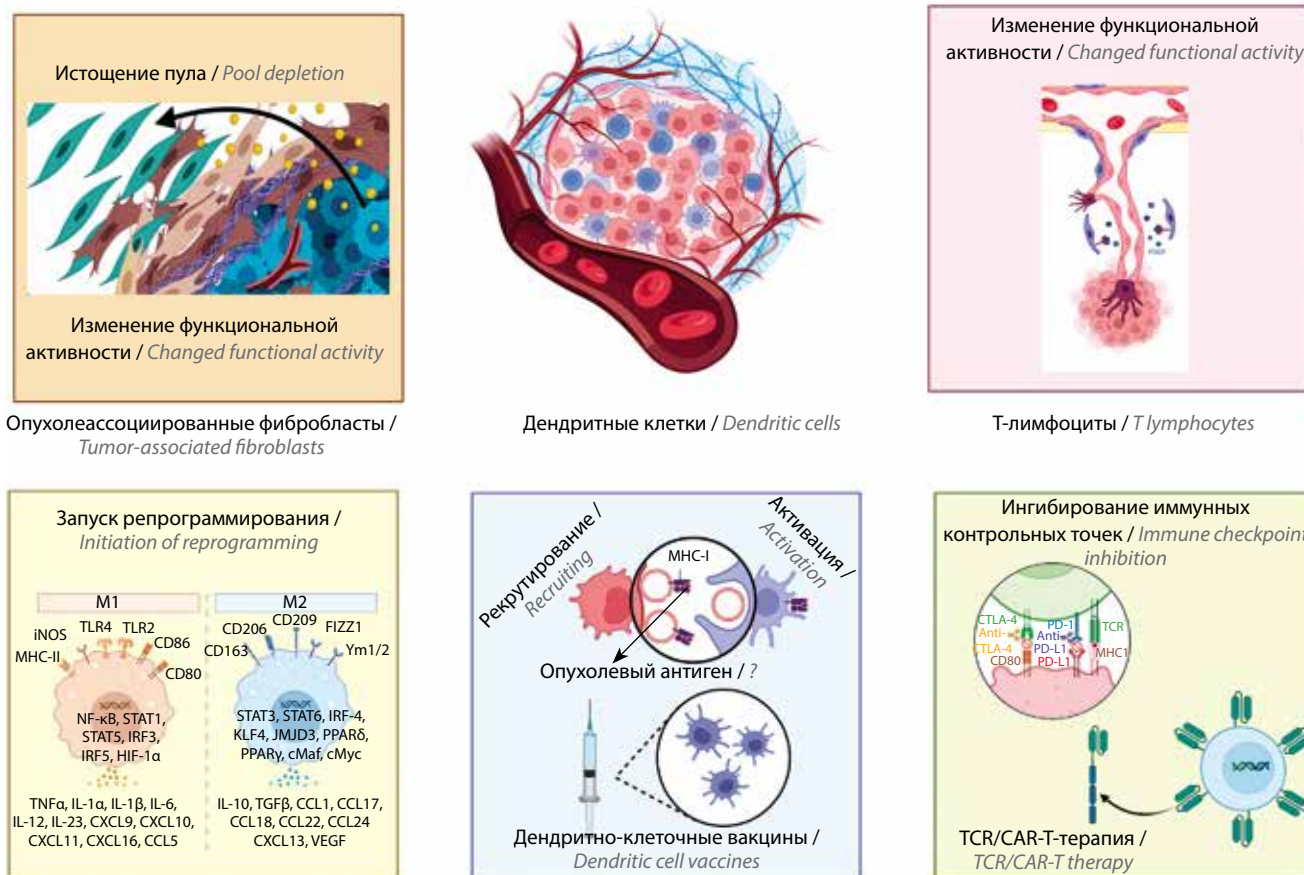


Рис. 2. Клеточный состав микроокружения опухоли и основные стратегии современной противоопухолевой терапии. M1 – макрофаги фенотипа M1; M2 – макрофаги фенотипа M2; iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота; TLR4 – толл-подобный рецептор 4; TLR2 – толл-подобный рецептор 2; NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB; HIF-1α – фактор, индуцируемый гипоксией 1-α; TNFα – фактор некроза опухоли α; IL-1α – интерлейкин-1α; IL-1β – интерлейкин-1β; IL-6 – интерлейкин-6; IL-12 – интерлейкин-12; IL-23 – интерлейкин-23; IL-10 – интерлейкин-10; TGFβ – трансформирующий фактор роста β; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; TCR – опухолеподобные рецепторы; CAR – химерные антигенные рецепторы

Fig. 2. Cellular composition of tumor microenvironment and main strategies of current antitumor therapy. M1 – M1 phenotype macrophages; M2 – M2 phenotype macrophages; iNOS – inducible nitric oxide synthase; TLR4 – toll-like receptor 4; TLR2 – toll-like receptor 2; NF-κB – nuclear factor κB; HIF-1α – hypoxia-inducible factor 1-α; TNFα – tumor necrosis factor α; IL-1α – interleukin-1α; IL-1β – interleukin-1β; IL-6 – interleukin-6; IL-12 – interleukin-12; IL-23 – interleukin-23; IL-10 – interleukin-10; TGFβ – transforming growth factor β; VEGF – vascular endothelial growth factor; TCR – T-cell receptors; CAR – chimeric antigen receptors

на ангиогенные факторы, их ионные каналы и транспортеры (рис. 2; табл. 1).

Цель обзора – показать роль компонентов ТМЕ в канцерогенезе, проанализировать пути и механизмы воздействия на основные популяции клеток, представляющие наибольший интерес в контексте разработки новых подходов к противоопухолевой терапии.

ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

В большинстве солидных опухолей эндотелиальные клетки (tumor endothelial cells, TEC) образуют внутреннюю поверхность кровеносных сосудов [5]. Одним из механизмов образования данной популяции клеток выступает непосредственно дифференцировка опухолевых клеток, в результате которой формируется патологический фенотип эндотелиоцитов [6].

Ключевая роль ТЕС в процессах канцерогенеза сводится к формированию сосудистых сетей, ассоциированных с опухолью. К настоящему времени описаны несколько возможных путей запуска опухолевого ангиогенеза. Классический вариант формирования кровеносных сосудов опосредован участием эндотелиоцитов, которые активизируются под влиянием проангиогенных молекул, включая фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF) и фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor, PDGF), синтезируемых клетками опухоли. Параллельно под действием металлопротеиназ и других протеолитических ферментов происходит деградация базальной мембраны и стромы. Указанные стимулы побуждают клетки эндотелия к активной пролиферации и формированию

каналоподобных структур, которые впоследствии модифицируются в зрелые кровеносные сосуды [7]. С учетом вклада ТЕС в канцерогенез в настоящее время данная популяция клеток рассматривается как незаменимая мишень терапии рака.

Существующие стратегии для разработки противоопухолевых таргетных препаратов ставят перед собой глобальную цель блокировки процессов ангиогенеза путем ингибирования синтеза факторов роста или других проангиогенных молекул, участвующих в миграции и пролиферации эндотелиальных клеток [8].

Недавно в научной литературе был представлен пример эффективного антиангиогенного терапевтического подхода, который заключается в нарушении передачи сигнала между популяциями ТЕС и опухолеассоциированными фибробластами (cancer-associated fibroblasts, CAF), или собственно опухолевыми клетками, под воздействием наночастиц золота. В исследовании *in vitro* Y. Zhang и соавт. на клеточной модели рака яичников продемонстрирована способность наночастиц золота дестабилизировать процесс активации рецептора 2 VEGF (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2). По результатам исследования, нарушение сигнальной кооперации опухолевых клеток с ТМЕ способствовало уменьшению интенсивности процессов миграции и снижению образования каналоподобных структур эндотелиоцитами [9].

Более того, ученые стали использовать функциональный потенциал ТЕС для создания противоопухолевой вакцины. Т. Nomiga и соавт. разработали иммунотерапию на основе дендритных клеток (DC), способную воздействовать на популяцию ТЕС. Так, на модели меланомы мышей B16/BL6 было показано, что профилактическая вакцинация DC, обработанными лизатами ТЕС, которые были выделены из вторично пораженных раком нижних дыхательных путей, значительно подавляет метастазирование в легкие экспериментальных животных. Авторы предполагают, что дендритно-клеточные вакцины, нацеленные на ТЕС, вероятно, будут демонстрировать положительные терапевтические результаты у пациентов с отдаленными метастазами при ЗНО различных локализаций [10].

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ

Опухолеассоциированные фибробласты представляют собой разнородную группу клеток различного происхождения, объединенных общими мезенхимными свойствами и расположенными в непосредственной близости от опухоли [11]. Особый интерес вызывает вопрос происхождения CAF. Несмотря на весьма дискуссионные данные в современной литературе, большинство авторов указывают на то, что источниками этих клеток могут быть резидентные фибробласты органа, в котором развилась опухоль [12]. Согласно некоторым источникам, предшественниками CAF могут выступать мезенхимальные и гемопоэтические

стволовые клетки костного мозга [13]. Существует и альтернативное мнение о возможности трансформации эпителиальных клеток опухоли в CAF в процессе эпителиально-мезенхимального перехода [14].

Достоверно известно, что в отличие от нормальных фибробластов CAF имеют дефекты и нарушения в генетическом аппарате по типу хромосомных аберраций [15]. К ключевым характеристикам активированных фибробластов относят значительную пролиферативную способность, высокую миграционную и секреторную активность [15]. Несмотря на значительный пул знаний, накопленный в отношении морфологических особенностей CAF, их функциональная роль в прогрессировании рака и метастазировании носит противоречивый характер. В научной литературе накоплено достаточно данных, позволяющих рассматривать эту популяцию клеток в качестве факторов прогрессирования рака [16], в то время как некоторые источники, напротив, указывают на супрессивный потенциал CAF в отношении процессов канцерогенеза [17]. Известно, что CAF продуцируют белки ECM, которые в свою очередь модулируют транспорт иммунных клеток и регулируют их функциональный статус [18]. Показано, что матрицы с преобладающим количеством коллагена реализуют преимущественно проонкогенные эффекты, в то время как ECM, богатые фибронектином, вызывают иммуносупрессию опухолевых клеток [19].

В ряде источников показана уникальная способность CAF обеспечивать опухолевые клетки энергией, поддерживая феномен аэробного гликолиза (эффект Варбурга). Показано, что секретируемые активированными фибробластами лактат и пируват активно используются в митохондриальном цикле опухолевых клеток [20].

В настоящее время накоплено достаточно данных, указывающих на вовлеченность CAF в развитие резистентности к противоопухолевой терапии. В работе G.M. Jiang и соавт. показано, что ингибирование ферментной активности CAF, экспрессирующих специфичный маркер — белок активации фибробластов (FAP), приводило к снижению показателя общей выживаемости у пациентов с колоректальным раком [21]. В исследовании T. Yoshida и соавт. сообщается о влиянии подоплатин-положительных CAF на развитие первичной резистентности к ингибиторам рецепторов тирозинкиназы эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI), которые представляют собой инновационную стратегию в лечении немелкоклеточного рака легкого. Точные механизмы возникновения лекарственной устойчивости остаются до конца не ясными, однако существует мнение о возможной реализации CAF-зависимого пути увеличения давления внутриопухолевой интерстициальной жидкости, что приводит к снижению эффективности захвата противоопухолевых препаратов [22].

Иновационные таргетные противоопухолевые препараты, нацеленные на основные популяции микроокружения опухоли
 Innovative targeted antitumor drugs aimed at the main populations of tumor microenvironment

| Мишень Target | Препарат Drug | Тип препарата Drug type | Механизм действия Mechanism of action |
|--|--|---|---|
| Эндотелиальные опухолевые клетки (TEC) Tumor endothelial cells (TEC) | | | |
| Рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R) Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) | BLZ945, эдикотиниб, эмактузумаб, PLX3397 BLZ945, edicotinib, emactuzumab, PLX3397 | Нейтрализующие антитела и ингибиторы малых молекул Neutralizing antibodies and small molecule inhibitors | Снижение макрофагальной инфильтрации или запуск репрограммирования фенотипа макрофагов Decreased macrophage infiltration and initiation of macrophage phenotype reprogramming |
| С-С-мотив хемокин лиганд 2 (CCL2) C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) | Карлумаб Carlumab | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Снижение рекрутирования моноцитов и макрофагов Decreased recruiting of monocytes and macrophages |
| С-С-мотив хемокин рецептор 2 (CCR2) C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) | MLN1202, PF-04136309 и TAK202 MLN1202, PF-04136309 and TAK202 | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Снижение рекрутирования моноцитов и макрофагов Decreased recruiting of monocytes and macrophages |
| CD40 | Chi Lob 7/4, CP-870893 и дакетузумаб Chi Lob 7/4, CP-870893 and dacetuzumab | Агонистические антитела Agonistic antibodies | Активация антигенпрезентирующих клеток для реализации потенциала Т-клеточного противоопухолевого иммунитета Activation of antigen-presenting cells for realization of T-cell antitumor immunity |
| CD47 | CC-90002, магролимаб и ZL-1201 CC-90002, magrolimab and ZL-1201 | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Ингибирование взаимодействия CD47 и SIRPα с последующим нарушением сигнала «это свой — не ешь его» Inhibition of CD47 and SIRPα interaction with subsequent disruption of «do not eat me» signal |
| Сигнальный регуляторный белок α (SIRPα) Signal-regulatory protein α (SIRPα) | ТТИ-621 и ТТИ-622 TTI-621 and TTI-622 | Рекомбинантный слитый белок Recombinant fusion protein | Нарушение сигналинга в системе «это свой — не ешь его» Disruption of signaling in the «do not eat me» system |
| Фосфатидилинозитол-3-киназа γ (PI3Kγ) Phosphoinositide 3-kinase γ (PI3Kγ) | Эганелисиб Eganelisib | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Поляризация макрофагов в M2-фенотип Macrophage polarization into the M2 phenotype |
| Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2 (TREM2) Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) | PY314 | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Поляризация макрофагов в M2-фенотип Macrophage polarization into the M2 phenotype |
| Опухлеассоциированные фибробласты (CAF) Cancer-associated fibroblasts (CAF) | | | |
| Гиалуроновая кислота Hyaluronic acid | PEGPH20 | Пегилированный фермент Pegylated enzyme | Деградация гиалуроновой кислоты Hyaluronic acid degradation |
| Лизилоксидазоподобный белок 2 (LOXL2) Lysyl oxidase-like protein 2 (LOXL2) | Симтузумаб Simtuzumab | Блокирующие антитела Blocking antibodies | Дестабилизация коллагеновых сетей Collagen network destabilization |
| Киназа фокальных контактов (FAK) Focal adhesion kinase (FAK) | Дефактиниб (VS-6063, PF-04554878) и GSK-2256098 Defactinib (VS-6063, PF-04554878) and GSK-2256098 | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Нарушение передачи сигнала через интегрины Disruption of signal transmission through integrins |

Продолжение таблицы
Continuation of table

| Мишень Target | Препарат Drug | Тип препарата Drug type | Механизм действия Mechanism of action |
|---|---|--|---|
| Опухолеассоциированные фибробласты (CAF) Cancer-associated fibroblasts (CAF) | | | |
| Фактор роста соединительной ткани (CTGF) Connective tissue growth factor (CTGF) | Памревлумаб (FG-3019) Pamrevlumab (FG-3019) | Блокирующие антитела Blocking antibodies | Нарушение передачи сигнала через интегрины Disruption of signal transmission through integrins |
| Клетки, экспрессирующие белок активации фибробластов (FAP) Cells expressing fibroblast activation protein (FAP) | PT630, RO6874281 | Блокирующие антитела, ингибиторы малых молекул Blocking antibodies, small molecule inhibitors | Влияние на функциональную активность CAF, активация Т-клеточного звена Effect on CAF functional activity, activation of the T cell branch |
| Трансформирующий фактор роста β (TGFβ) Transforming growth factor β (TGFβ) | Галунисертиб Galunisertib | Ингибиторы малых молекул и блокирующие антитела Small molecule inhibitors and blocking antibodies | Предотвращение полноценной активации CAF и нарушение внутриклеточного сигналинга Prevention of full CAF activation and disruption of intracellular signaling |
| Рецептор фактора роста фибробластов (FGFR) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) | Эрдафитиниб (JNJ-42756493) Erdafitinib (JNJ-42756493) | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Предотвращение полноценной активации CAF Prevention of full CAF activation |
| Сигнальный путь Hedgehog Hedgehog signaling pathway | Саридигиб, висмодегиб Saridigib, vismodegib | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Предотвращение полноценной активации CAF Prevention of full CAF activation |
| Rho-ассоциированная протеинкиназа (ROCK) Rho-associated protein kinase (ROCK) | AT13148 | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Влияние на функциональную активность CAF Effect on CAF functional activity |
| C-X-C-мотив хемокин рецептор 4 (CXCR4) C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) | AMD3100 | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Нарушение межклеточного сигналинга CAF с опухолевыми клетками Disruption of intercellular signaling between CAF and tumor cells |
| Витамин D Vitamin D | Парикальцитол Paricalcitol | Агонист малых молекул Small-molecule agonist | Нормализация функциональной активности CAF Normalization of CAF functional activity |
| Метаболизм витамина А Vitamin A metabolism | АТРА | Метаболит витамина А Vitamin A metabolite | Нормализация функциональной активности CAF Normalization of CAF functional activity |
| Дендритные клетки Dendritic cells | | | |
| Лиганд fms-подобной тирозинкиназы 3 (FLT3L) Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (FLT3L) | CDX-301 (FLT3L) | Рекомбинантный цитокин Recombinant cytokine | Инфильтрация опухоли дендритными клетками Tumor infiltration by dendritic cells |
| Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) | Вакцины GM-CSF, GM-CSF, лейцин и сарграмостин GM-CSF, GM-CSF vaccines, leucin and sargramostin | Цитокин Cytokine | Активизация и стимуляция дифференцировки дендритных клеток Activation and stimulation of dendritic cell differentiation |

Продолжение таблицы

Continuation of table

| Мишень Target | Препарат Drug | Тип препарата Drug type | Механизм действия Mechanism of action |
|---|--|---|---|
| Клетки иммунной системы Immune system cells | | | |
| Цитотоксический Т-лимфоцитарный белок 4 (CTLA4) Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) | Ипилимумаб Ipilimumab | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Блокировка тормозных сигналов каскада CTLA4, сопровождающаяся увеличением количества противоопухолевых Т-хелперов и прямых Т-киллеров Blocking of CTLA4 cascade signals accompanied by increased number of antitumor T helpers and direct T killers |
| Лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) Programmed death ligand-1 (PD-L1) | Атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб Atezolizumab, avelumab and durvalumab | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Связывание с PD-L1, блокировка опосредованного PD-L1/PD-1 подавления иммунного ответа, реактивация Т-клеточного противоопухолевого иммунитета Binding to PD-L1, blocking of indirect immune response suppression through PD-L1/PD-1, reactivation of T cell antitumor immunity |
| Белок программированной клеточной гибели 1 (PD-1) Programmed death protein-1 (PD1) | Ниволюмаб, PDR001 и пембролизумаб Nivolumab, PDR001 and pembrolizumab | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Связывание с рецептором PD-1, блокировка взаимодействия с его лигандами PD-L1 и PD-L2, ингибирование пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов Binding to PD-1 receptor, blocking of its interaction with PD-L1 and PD-L2, inhibition of T cell activation and cytokine secretion |
| Ген активации лимфоцитов 3 (LAG3) Lymphocyte activation gene 3 (LAG3) | FS118, GSK2831781, IMP321, IMP761, LAG525 и релатлимаб FS118, GSK2831781, IMP321, IMP761, LAG525 and relatlimab | Блокирующие и антагонистические биспецифические антитела Blocking and antagonistic bispecific antibodies | Блокировка взаимодействия МНС-II-LAG3 Blocking of MHC-II-LAG3 interaction |
| Т-клеточный иммуноглобулин и муцин/домен муцина (TIM3) T cell immunoglobulin and mucin domain-3 (TIM3) | Коболимаб, INCAGN2390, MBG453 и Sym023 Cobolimab, INCAGN2390, MBG453 and Sym023 | Антагонистические антитела Antagonistic antibodies | Связывание с TIM3, экспрессируемое на определенных Т-клетках, включая ТИЛ, что предотвращает ингибирование функциональной активности Т-клеток TIM3 binding expressed on specific T cells including TILs which prevents inhibition of T cell functional activity |
| Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT) T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) | Тираголумаб, AB154 или BMS-986207 Tiragolumab, AB154 or BMS-986207 | Блокирующие антитела Blocking antibodies | Связывание с белком TIGIT для предотвращения взаимодействия с его лигандами Binding to TIGIT protein to prevent its interaction with ligands |
| Сосудистая сеть опухоли Tumor vascular network | | | |
| Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) Vascular epithelial growth factor (VEGF) | Афлиберцепт, бевацизумаб, рамуцирумаб Aflibercept, bevacizumab, ramucirumab | Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies | Блокировка активации рецепторов VEGF и пролиферации эндотелиальных клеток, что подавляет образование новых сосудов Blocking of VEGF receptor activation and proliferation of endothelial cells leading to suppression of formation of new vessels |
| Рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR)/другие рецепторные тирозинкиназы (RTK) Vascular epithelial growth factor receptor (VEGFR)/other receptor tyrosine kinases (RTK) | Пазопаниб, сорафениб и сунитиниб Pazopanib, sorafenib and sunitinib | Ингибиторы малых молекул Small molecule inhibitors | Подавление поверхностных и внутриклеточных киназ, задействованных в процессах ангиогенеза и апоптоза Suppression of surface and intracellular kinases involved in angiogenesis and apoptosis processes |

Окончание таблицы
The end of table 1

| Мишень Target | Препарат Drug | Тип препарата Drug type | Механизм действия Mechanism of action |
|--|--|---|--|
| Сосудистая сеть опухоли Tumor vascular network | | | |
| Ангиопоэтин 1 и рецептор тирозинкиназы эндотелиальных клеток (ANG2–TIE2) Angiopoietin 1 and endothelial cell tyrosine kinase receptor (ANG2–TIE2) | MEDI3617, ребастиниб и тревананиб MEDI3617, rebastinib and trebananib | Нейтрализующие антитела/пептитело, ингибиторы малых молекул Neutralizing antibodies/peptibodies, small molecule inhibitors | Ингибирование функциональной активности белка Bcr–Abl и киназ семейства Src LYN, HCK, FGR, а также рецепторных тирозинкиназ TIE-2 и VEGFR-2, регулирующих ангиогенез Inhibition of Bcr–Abl protein and Src family kinases LYN, HCK, FGR, as well as receptor tyrosine kinases TIE-2 and VEGFR-2 regulating angiogenesis |

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ

Подобно САФ, популяция опухолеассоциированных макрофагов (tumor-associated macrophages, TAM) – макрофагов, привлеченных в зону роста злокачественной опухоли, – отличается своей фенотипической и функциональной гетерогенностью [23]. По происхождению TAM представлены долгоживущими тканевыми резидентными макрофагами, происходящими из эритромиелоидных клеток желточного мешка, и короткоживущими макрофагальными клетками, образованными из циркулирующих моноцитов [24]. Рекрутирование последних в опухоль осуществляется за счет хемокинов CCL2 (MCP-1) и CCL5 (RANTES) и колониестимулирующего фактора (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) [25]. Интересно, что биологические эффекты указанных хемокинов имеют дозозависимый характер. Так, в случае низкой экспрессии CCL2 наблюдается активная пролиферация опухолевых клеток, в то время как высокий уровень экспрессии ассоциирован с регрессией ткани ЗНО, что, вероятно, связано с привлечением в зону роста злокачественного новообразования M1-поляризованных макрофагов, обладающих противоопухолевой активностью [26].

На сегодняшний день представления о функциональном потенциале популяции TAM расширились. Стало ясно, что в зависимости от фенотипических особенностей эти клетки либо отвечают за реализацию противоопухолевых механизмов иммунитета, либо поддерживают способность клеток ЗНО к миграции, инвазивному росту и метастазированию [27].

Экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали вовлеченность TAM в процессы ангиогенеза и лимфангиогенеза, включая деградацию компонентов базальной мембраны и продукцию проангиогенных медиаторов (VEGF, PRGF, FGF, EGF) [28]. В работе Y. Chen и соавт. показано, что активно продуцируемые TAM, цитокиновые и хемокиновые молекулы, в том числе интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10) и трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β, TGFβ), повышают

стволовость опухолевых клеток, стимулируя эпителиально-мезенхимальный переход [29].

Факт вовлеченности TAM в различные этапы канцерогенеза, а также двунаправленная способность модулировать различные иммунные и неиммунные процессы в опухоли делают эту популяцию клеток весьма перспективной в качестве потенциальной мишени в лечении ЗНО.

Реализация направления по элиминации TAM достигается преимущественно применением антител, связывающих рецептор колониестимулирующего фактора 1 (colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R) (препарат BLZ945), который представляет собой мощный гемопоэтический ростовой фактор, регулирующий дифференцировку макрофагов из моноцитов [30].

Уменьшение популяции TAM возможно также за счет использования токсических бифосфонатов, инкапсулированных в липосомы. Механизм действия данной биоинженерной конструкции основан на расщеплении компонентов плазматических мембран TAM фосфолипазами – ферментами, обладающими гидролитической активностью [31]. В исследовании M. Vancic и соавт. *in vivo* показано, что применение клодронатных липосом снижает приток новых моноцитов из кровотока и способствует ингибированию роста меланомы на 55 % по сравнению с контрольной группой [32]. В настоящий момент результаты клинических исследований остаются весьма противоречивыми, что требует проведения дополнительных уточняющих работ.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ

Еще одной популяцией клеток, составляющей иммунный ландшафт ТМЕ, являются дендритные клетки (DC). Они имеют костномозговое происхождение – происходят из плюрипотентной стволовой клетки, развитие которой осуществляется по одной из двух основных линий кроветворения: миелоидной или лимфоидной [33]. Последующая дифференцировка DC на различные субклассы происходит в зависимости от особенностей ТМЕ [33]. Согласно классическим представлениям DC рассматриваются как

профессиональные антигенпрезентирующие клетки, экспонирующие антигены в комплексе с человеческими лейкоцитарными антигенами (human leukocyte antigens, HLA) и опосредующие Т-клеточную активацию и созревание [34]. Между тем исследования последних лет позволили идентифицировать ряд характерных патологических морфофункциональных изменений популяции DC у пациентов онкологического профиля. Стало понятно, что клетки опухоли способны оказывать негативное влияние на процессы дифференцировки DC и реализацию ими противоопухолевого потенциала [35].

Известно, что популяция регуляторных иммуносупрессорных DC в составе ТМЕ экспрессирует высокие уровни ингибирующих лигандов – лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1), лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 2 (programmed death-ligand 2, PD-L2), B7-H3, B7-H4, CD103 и ILT3/4, – индуцируя истощение Т-цитотоксических лимфоцитов. В ряде работ показан рост секреторного потенциала регуляторных иммуносупрессорных DC в отношении продукции иммунорегуляторных факторов, в частности IL-10, интерлейкина-1 β (IL-1 β), TGF β [36]. Результаты других исследований демонстрируют, что на поверхности данной группы клеток отмечается снижение экспрессии молекул HLA II класса и костимулирующих молекул CD80 и CD86 [37].

По причине фенотипической гетерогенности уже в течение долгого времени ученые исследуют различные терапевтические стратегии нацеливания на DC, включая введение FMS-подобного лиганда тирозинкиназы 3 (FLT3L), для повышения жизнеспособности и пролиферативного потенциала пула нормальных функционально полноценных DC, модулирование активности DC с помощью гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) и создание DC-вакцин для повышения противоопухолевого иммунитета.

Ранее было показано, что передача сигналов посредством взаимодействия рецептора тирозинкиназы FLT3 и его лиганда – FLT3L – является критическим регуляторным механизмом для детерминации развития DC [38]. Введение FLT3L не только увеличивает количество полноценных DC в ТМЕ, но и обеспечивает стимулирование созревания DC, тем самым повышая эффективность праймирования Т-клеточного ответа [39]. Было показано, что рекомбинантный FLT3L (например, CDX-301) увеличивает количество DC и гемопоэтических предшественников у здоровых добровольцев [40]. В исследованиях *in vivo* на моделях немелкоклеточного рака легкого введение FLT3L повышало клиническую эффективность применения локальной лучевой терапии [41]. Пациентам с острым миелоидным лейкозом CDX-301 назначали в качестве монотерапии в ходе исследования фазы III (NCT00006223),

однако результаты испытания еще не опубликованы. CDX-301 также проходит клиническую оценку у пациентов с солидными опухолями, и хотя иммуногенность и безопасность препарата были продемонстрированы в исследованиях I и II фаз (NCT00003431), его влияние на стойкость ремиссии еще предстоит определить.

Бурно развивающимся направлением экспериментальной и клинической онкологии уже на протяжении более 20 лет остается создание вакцин на основе DC. Технология их разработки подразумевает получение DC *in vitro* из аутологичных гемопоэтических предшественников периферической крови пациента с последующей их сенсibilизацией соответствующими (опухолевыми) антигенами с целью индукции клинически значимого противоопухолевого иммунного ответа.

При этом, несмотря на достигнутые успехи, в отношении некоторых типов опухолей DC-вакцины демонстрируют неполный клинический эффект, что может объясняться разнонаправленным влиянием компонентов ТАМ в отношении супрессии иммунного ответа [42].

Т-ЛИМФОЦИТЫ

В контексте формирования иммунного ответа как ведущего фактора противоопухолевой защиты наиболее значимую роль играет Т-клеточное звено. Доказано, что увеличение содержания популяции Т-цитотоксических лимфоцитов в составе ТМЕ сопровождается более благоприятным прогнозом при ЗНО различных локализаций.

В отношении функционального потенциала лимфоцитов авторы ряда публикаций указывают на общность состояния анергии, которое характерно для Т-клеток в составе ТМЕ. Т-клеточная анергия рассматривается как длительное устойчивое состояние гипореактивности, сопровождающееся сниженной пролиферативной активностью, неспособностью отвечать на антигенную стимуляцию, а также нарушением цитокиновой продукции. Вопрос о механизмах данного явления все еще остается открытым [43].

Помимо этого, сложная регуляторная сеть ТМЕ может оказывать непосредственное влияние на метаболическое состояние и доступность питательных веществ для Т-лимфоцитов [34]. Известно, что увеличение числа адипоцитов и адипоцитоподобных фибробластов, а также продукция опухолевыми клетками значительного количества жирных кислот вызывает дисбаланс липидного обмена в ТМЕ. Однако чрезмерное потребление глюкозы опухолевыми клетками не только вызывает состояние гипогликемии в Т-лимфоцитах, но и сопровождается накоплением значительного количества лактата. Указанные изменения метаболизма способствуют подавлению эффекторных функций цитотоксических Т-клеток и увеличению пула Tregs [44].

Биология Т-лимфоцитарного звена иммунитета сложна, однако на сегодняшний день не вызывает

сомнений тот факт, что решение дискуссионных вопросов в этом направлении может привести к разработке новых высокоточных методов иммунотерапии.

Известно, что некоторые негативные регуляторы активации Т-клеток могут функционировать как контрольные точки, осуществляя регуляцию функции иммунной системы и предотвращая иммунную гиперактивацию. К ним относятся CTLA4 и PD-1, которые в настоящее время являются наиболее частыми мишенями для разработки препаратов группы ингибиторов иммунных контрольных точек [45]. Хотя несколько доклинических исследований показали, что блокада CTLA4 может индуцировать долговременную иммунологическую память при различных типах ЗНО [46, 47], в случае использования данной тактики в опухолевых очагах более крупного размера или при менее иммуногенных карциномах значимого клинического эффекта не наблюдается [48].

Блокада CTLA4 с помощью моноклонального антитела – ипилимумаба – впервые продемонстрировала положительные терапевтические результаты у пациентов с метастатической меланомой в исследовании 2011 г. [49]. Достигнутые успехи побудили к одобрению этого препарата для использования в США и еще 40 странах мира. В 2014 г. пембролизумаб и ниволумаб стали первыми иммунотерапевтическими лекарственными средствами, нацеленными на PD-1, утвержденными Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) для лечения больных меланомой [50]. По сравнению с ипилимумабом пембролизумаб продемонстрировал более существенное 6-месячное улучшение безрецидивной выживаемости и большее преимущество в отношении общей выживаемости наряду с более безопасным профилем токсичности [51]. Впоследствии пембролизумаб был одобрен для лечения немелкоклеточного рака легкого, уротелиальной карциномы и плоскоклеточного рака головы и шеи. Применение ниволумаба привело к аналогичным результатам: 1-летняя общая выживаемость пациентов, получавших данный препарат, составила 72,9 % по сравнению с 42,1 % у больных с меланомой, которым назначалась только химиотерапия дакарбазином [52].

Лиганд PD-1 также играет большую роль в регуляции иммунных реакций. Обычно он экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках и осуществляет контроль дифференцировки Treg [53]. Первым моноклональным антителом, нацеленным на PD-L1 и показавшим свою эффективность в отношении рака мочевого пузыря, стал атезолизумаб [54]. В 2016 г. данный препарат был одобрен FDA в качестве средства иммунотерапии рецидивирующего или метастатического уротелиального рака. В последующем атезолизумаб нашел применение у пациентов с немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легкого, а также

трижды негативным раком молочной железы. Несмотря на то что выход на рынок данной группы препаратов обусловил значительный прогресс в терапии широкого спектра онкологических заболеваний, на сегодняшний день все же остается значительный процент пациентов, у которых наблюдается резистентность к терапии ингибиторами CTLA4 и PD-1/PD-L1.

Еще одним многообещающим вариантом противоопухолевой терапии является адоптивная Т-клеточная терапия, основывающаяся на использовании лимфоцитов, изолированных из опухолевого материала или периферической крови пациентов. Ключевыми преимуществами данной технологии являются возможность экспансии Т-клеток и устранение иммуносупрессивного влияния ТМЕ [55].

Первые работы, основывающиеся на использовании опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (tumor-filtering lymphocytes, TIL), предварительно выделенных из опухолевого очага и размноженных *ex vivo*, продемонстрировали клинические успехи в отношении лечения рака легких, печени и опухолей мягких тканей [56]. При этом одной из основных проблем TIL-терапии стала ее зависимость от наличия функционально полноценных эффекторных Т-клеток с противоопухолевой активностью [57]. Кроме того, технические трудности возникли при активации и размножении пула этих клеток.

В связи с этим в последующем были разработаны новые стратегии генетической модификации Т-клеток, экспрессирующих специфичные к опухолевым антигенам рецепторы – химерные антигенные рецепторы (CAR) или опухолеподобные рецепторы (TCR). Это направление получило название TCR/CAR-Т-терапия. Оба подхода подразумевают трансдукцию Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови генами опухолеспецифичных рецепторов. В отличие от стратегии применения TCR-Т-лимфоцитов подход, основанный на генетической модификации Т-клеток генами, кодирующими химерный антигенный рецептор, имеет преимущество, выражающееся в способности к распознаванию более широкого спектра антигенов [58]. В клинике CAR-Т-клеточная терапия оказалась чрезвычайно успешной при гематологических ЗНО. Положительный опыт анти-CD19 CAR-Т-терапии привел к одобрению FDA 3 препаратов данной терапевтической группы для лечения острого лимфобластного лейкоза, рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы и лимфомы из клеток мантийной зоны [58].

Сегодня существует также иной подход, предполагающий создание CAR-Т-клеток для воздействия на иммуносупрессивные свойства ТМЕ и восстановления истощенных Т-клеток [59]. Это так называемые бронированные CAR-Т-клетки, или CAR-Т-клетки 4-го поколения, обладающие активностью CAR 2-го поколения и способностью к секреции цитокинов [60]. Несмотря на имеющийся положительный опыт

применения TCR/CAR-T в лечении некоторых ЗНО, все же значительным недостатком данных инновационных терапевтических концепций, ограничивающим их практическое применение, является высокая токсичность препаратов. Многочисленные побочные эффекты объясняются возникающей кросс-реактивностью к схожим мишеням, расположенным вне опухолевых тканей [58]. Таким образом, представляется перспективным поиск новых стратегий для устранения этих проблем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнения большая роль ТМЕ в канцерогенезе. Динамические взаимоотношения между опухолевыми клетками и ТМЕ имеют решающее значение в развитии и прогрессировании злокачественного процесса. С учетом мультифункционального потенциала гетерогенных популяций, окружающих опухоль, стратегия нацеливания на ТМЕ уже давно рассматривается как перспективный подход в современной противоопухолевой терапии. На сегодняшний день уже существует ряд одобренных лекарственных средств, направленных на стромальный и иммунный компоненты, ангиогенные факторы, ионные каналы и транспортеры.

Анализ научной базы по данному вопросу позволил заключить, что даже самые мощные инновационные таргетные противоопухолевые препараты, нацеленные на ТМЕ, демонстрируют ограниченную эффективность. Это связано с дисфункцией эффекторных клеток и им-

муносупрессивным потенциалом ТМЕ. Исходя из этого, можно предположить, что в ближайшее время развитие биотехнологического кластера в сфере создания противоопухолевых препаратов будет сопряжено с дальнейшей разработкой лекарств, преодолевающих данные механизмы. На сегодняшний день уже наметились несколько перспективных стратегий воздействия на сосудистую сеть опухоли в сочетании с иммунотерапией.

При этом стоит отметить, что, несмотря на значительные успехи в молекулярной онкологии, сохраняет актуальность проблема противоречивости некоторых теоретических данных, что диктует потребность в дополнительном изучении особенностей взаимодействия клеток опухоли и ТМЕ. На наш взгляд, крайне важен комплексный подход, при котором мы интегрируем знания об основных сигнальных путях и механизмах взаимодействия в системе «опухоль – ТМЕ». Популяционный состав ТМЕ может существенно варьировать в зависимости от вида ЗНО, в связи с чем нельзя экстраполировать результаты конкретного исследования на различные типы опухолей. Внимание также стоит направить на вопросы, связанные с воздействием на ТМЕ эндогенных и экзогенных факторов. Так, микробиом желудочно-кишечного тракта, особенности питания или физические нагрузки могут изменять ТМЕ и влиять на эффективность таргетных препаратов. Лучшее понимание данных механизмов откроет перспективы для появления новых стратегий противоопухолевой терапии с целью повышения результативности лечения пациентов онкологического профиля.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer* 2013;4(1):66–83. DOI: 10.7150/jca.5112
2. Зибиров Р.Ф., Мозеров С.А. Характеристика клеточного микроокружения опухоли. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена* 2018;7(2):67–72. Zibirov R.F., Mozerov S.A. Characterization of the tumor cell microenvironment. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gercena = P.A. Herzen Journal of Oncology* 2018;7(2):67–72. (In Russ.). DOI: 10.17116/onkolog20187267-72
3. Атаи А., Соловьева В.В., Ризванов А.А., Араб С.Ш. Микроокружение опухоли: ключевой фактор развития рака, инвазии и лекарственной устойчивости. *Ученые записки Казанского университета. Серия «Естественные науки»* 2020;162:507–28. DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.507-528 Ataei A., Solovyeva V.V., Rizvanov A.A., Arab S.Sh. Tumor microenvironment: a key contributor to cancer progression, invasion, and drug resistance. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki = Scientific notes of Kazan University. Series "Natural Sciences"* 2020;162:507–28. (In Russ.). DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.507-528
4. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В. и др. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления. *Acta Naturae* 2015;7(2):18–31. Krahmal' N.V., Zav'jalova M.V., Denisov E.V. et al. Invasion of tumor epithelial cells: mechanisms and manifestations. *Acta Naturae* 2015;7(2):18–31. (In Russ.).
5. Dudley A.C. Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(3):a006536. DOI: 10.1101/cshperspect.a006536
6. Baghban R., Roshangar L., Jahanban-Esfahlan R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* 2020;18(1):59. DOI: 10.1186/s12964-020-0530-4
7. Gille H., Kowalski J., Li B. et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): a reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001;276:3222–30. DOI: 10.1074/jbc.M002016200
8. Daei Farshchi Adli A., Jahanban-Esfahlan R., Seidi K. et al. An overview on Vadimezan (DMXAA): The vascular disrupting agent. *Chem Biol Drug Des* 2018;91(5):996–1006. DOI: 10.1111/cbdd.13166
9. Zhang Y., Xiong X., Huai Y. et al. Gold nanoparticles disrupt tumor microenvironment – endothelial cell cross talk to inhibit angiogenic

- phenotypes *in vitro*. *Bioconjug Chem* 2019;30(6):1724–33. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00262
10. Nomura T., Yamakawa M., Shimaoka T. et al. Development of dendritic cell-based immunotherapy targeting tumor blood vessels in a mouse model of lung metastasis. *Biol Pharm Bull* 2019;42(4):645–8. DOI: 10.1248/bpb.b18-00737
 11. Liu T., Zhou L., Li D. et al. Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* 2019;7:60. DOI: 10.3389/fcell.2019.00060
 12. Puré E., Hingorani S.R. Mesenchymal cell plasticity and perfidy in epithelial malignancy. *Trends Cancer* 2018;4(4):273–7. DOI: 10.1016/j.trecan.2018.02.007
 13. Shiga K., Hara M., Nagasaki T. et al. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers* 2015;7(4):2443–58. DOI: 10.3390/cancers7040902
 14. Ермаков М.С., Нуштаева А.А., Рихтер В.А., Коваль О.А. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2022;26(1):14–21. DOI: 10.18699/VJGB-22-03
 15. Ermakov M.S., Nushtaeva A.A., Richter V.A., Koval O.A. Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2022;26(1):14–21. (In Russ.). DOI: 10.18699/VJGB-22-03
 15. Hosein A.N., Wu M., Arcand S.L. et al. Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations. *Cancer Res* 2010;70(14):5770–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0673
 16. Олейникова Н.А., Данилова Н.В., Михайлов И.А. и др. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их значение в прогрессии злокачественных новообразований. *Архив патологии* 2020;82(1):68–77. DOI: 10.17116/patol20208201168
 17. Oleynikova N.A., Danilova N.V., Mikhailov I.A. et al. Cancer-associated fibroblasts and their significance in tumor progression. *Arkhiv Patologii = Pathology Archive* 2020;82(1):68–77. (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20208201168
 17. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):582–98. DOI: 10.1038/nrc.2016.73
 18. Monteran L., Erez N. The dark side of fibroblasts: cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. *Front Immunol* 2019;10:1835. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01835
 19. Jones J.O., Moody W.M., Shields J.D. Microenvironmental modulation of the developing tumor: an immune-stromal dialogue. *Mol Oncol* 2021;15(10):2600–33. DOI: 10.1002/1878-0261.12773
 20. Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Castello-Cros R. et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 2009;8(23):3984–4001. DOI: 10.4161/cc.8.23.10238
 21. Jiang G.M., Xu W., Du J. et al. The application of the fibroblast activation protein alpha-targeted immunotherapy strategy. *Oncotarget* 2016;7(22):33472–82. DOI: 10.18632/oncotarget.8098
 22. Yoshida T., Ishii G., Goto K. et al. Podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment induce primary resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. *Clin Cancer Res* 2015;21(3):642–51. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0846
 23. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41(1):49–61. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.010
 24. Laviron M., Boissonnas A. Ontogeny of tumor-associated macrophages. *Front Immunol* 2019;10:1799. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01799
 25. Mantovani A., Sica A., Sozzani S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25(12):677–86. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015
 26. Nesbit M., Schaidler H., Miller T.H., Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 2001;166(11):6483–90. DOI: 10.4049/jimmunol.166.11.6483
 27. Porta C., Subhra Kumar B., Larghi P. et al. Tumor promotion by tumor-associated macrophages. *Adv Exp Med Biol* 2007;604:47–86. DOI: 10.1007/978-0-387-69116-9_5
 28. Valkovic T., Dobrila F., Melato M. et al. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch* 2002;440(6):583–8. DOI: 10.1007/s004280100458
 29. Chen Y., Tan W., Wang C. Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial-mesenchymal transition. *Oncotargets Ther* 2018;11:3817–26. DOI: 10.2147/OTT.S168317
 30. Mantovani A., Marchesi F., Malesci A. et al. Tumor-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(7):399–416. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217
 31. Van Rooijen N., Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994;174(1–2):83–93. DOI: 10.1016/0022-1759(94)90012-4
 32. Banciu M., Metselaar J.M., Schifflers R.M., Storm G. Antitumor activity of liposomal prednisolone phosphate depends on the presence of functional tumor-associated macrophages in tumor tissue. *Neoplasia* 2008;10(2):108–17. DOI: 10.1593/neo.07913
 33. Sato K., Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int* 2007;56(3):183–91. DOI: 10.2332/allergolint.R-06-139
 34. Олейник Е.К., Шибаев М.И., Игнатъев К.С. и др. Микроокружение опухоли: формирование иммунного профиля. *Медицинская иммунология* 2020;22(2):207–20. DOI: 10.15789/1563-0625-TMT-1909
 35. Oleinik E.K., Shibaev M.I., Ignatyev K.S. et al. Tumor microenvironment: the formation of the immune profile. *Medicinskaya immunologiya = Medical Immunology*. 2020;22(2):207–20. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-TMT-1909
 35. Shurin M.R., Yurkovetsky Z.R., Tourkova I.L. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer* 2002;101(1):61–8. DOI: 10.1002/ijc.10576
 36. Manavalan J.S., Rossi P.C., Vlad G. et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003;11(3–4):245–58. DOI: 10.1016/s0966-3274(03)00058-3
 37. Liu Q., Zhang C., Sun A. et al. Tumor-educated CD11b^{high}IL10 regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol* 2009;182(10):6207–16. DOI: 10.4049/jimmunol.0803926
 38. Anandasabapathy N., Victoria G.D., Meredith M. et al. Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain. *J Exp Med* 2011;208(8):1695–705. DOI: 10.1084/jem.20102657
 39. Salmon H., Idoyaga J., Rahman A. et al. Expansion and activation of CD103(+) dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition. *Immunity* 2016;44(4):924–38. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.03.012
 40. Anandasabapathy N., Breton G., Hurley A. et al. Efficacy and safety of CDX-301, recombinant human Flt3L, at expanding dendritic cells and hematopoietic stem cells in healthy human volunteers. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(7):924–30. DOI: 10.1038/bmt.2015.74
 41. Agrawal V., Benjamin K.T., Ko E.C. Radiotherapy and immunotherapy combinations for lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2020;23(1):4. DOI: 10.1007/s11912-020-00993-w
 42. Anguille S., Smits E.L., Lion E. et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 2014;15(7):e257–67. DOI: 10.1016/s1470-2045(13)70585-0

43. Jiang Y., Li Y., Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 2015;6(6):e1792. DOI: 10.1038/cddis.2015.162
44. Chang C.H., Curtis J.D., Maggi L.B. et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013;153(6):1239–51. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.016
45. Fife B.T., Bluestone J.A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008;224:166–82. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x
46. Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996;271(5256):1734–6. DOI: 10.1126/science.271.5256.1734
47. Kwon E.D., Hurwitz A.A., Foster B.A. et al. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(15):8099–103. DOI: 10.1073/pnas.94.15.8099
48. Hurwitz A.A., Yu T.F., Leach D.R., Allison J.P. CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(17):10067–71. DOI: 10.1073/pnas.95.17.10067
49. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711–23. DOI: 10.1056/NEJMoa1003466
50. Weber J.S., D'Angelo S.P., Minor D. et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16(4):375–84. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8
51. Robert C., Schachter J., Long G.V. et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2015;372(26):2521–32. DOI: 10.1056/NEJMoa1503093
52. Robert C., Long G.V., Brady B. et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015;372(4):320–30. DOI: 10.1056/NEJMoa1412082
53. Gong J., Chehrizi-Raffle A., Reddi S., Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer* 2018;6(1):8. DOI: 10.1186/s40425-018-0316-z
54. Mann J.E. Atezolizumab (tecentriq®). *Oncology Times* 2017;39(4):31. DOI: 10.1097/01.cot.0000513325.52233.fl
55. Златник Е.Ю., Ситковская А.О., Непомнящая Е.М. и др. Достигновения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. *Казанский медицинский журнал* 2018;99(5):792–801. DOI: 10.17816/KMJ2018–792
- Zlatnik E.Yu., Sitkovskaja A.O., Nepomnjashhaja E.M. et al. Achievements and prospects of cellular technologies based on activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. *Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan Medical Journal* 2018;99(5):792–801. (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ2018–792
56. Rosenberg S.A., Mulé J.J., Spiess P.J. et al. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Exp Med* 1985;161(5):1169–88. DOI: 10.1084/jem.161.5.1169
57. Jackson H.J., Rafiq S., Brentjens R.J. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13(6):370–83. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.36
58. Устюгова Е.А., Савкина М.В., Горяев А.А. и др. Применение биомедицинских клеточных продуктов для лечения онкологических заболеваний. *БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2019;19(4):206–14. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-4-206-214
- Ustjugova E.A., Savkina M.V., Gorjaev A.A. et al. The use of biomedical cell products for the treatment of oncological diseases. *BIO-preparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIO medication. Prevention, diagnosis, treatment* 2019;19(4):206–14. (In Russ.). DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-4-206-214
59. Chang Z.L., Lorenzini M.H., Chen X. et al. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors. *Nat Chem Biol* 2018;14(3):317–24. DOI: 10.1038/nchembio.2565
60. Hartmann J., Schüßler-Lenz M., Bondanza A., Buchholz C.J. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med* 2017;9(9):1183–97. DOI: 10.15252/emmm.201607485

Благодарность. Рисунки были подготовлены с использованием адаптированных материалов BioRender.com (<https://www.biorender.com/>).
Acknowledgment. The figures were prepared using adapted materials (BioRender.com license at <https://www.biorender.com/>).

Вклад авторов

А.В. Кубышкин, Е.Ю. Зяблицкая: научное редактирование;
 Л.Е. Сорокина, А.В. Серебрякова, П.Е. Максимова, А.Э. Лазарев: сбор, анализ и интерпретация данных литературы;
 К.А. Алиев, А.И. Балакчина, И.О. Головкин: написание текста статьи.

Authors' contribution

A.V. Kubyshkin, E.Yu. Zyablitskaya: scientific editing;
 L.E. Sorokina, A.V. Serebryakova, P.E. Maksimova, A.E. Lazarev: collection, analysis and interpretation of literature data;
 K.A. Aliyev, A.I. Balakchina, I.O. Golovkin: article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Ю. Зяблицкая / E.Yu. Zyablitskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8216-4196>
 А.В. Кубышкин / A.V. Kubyshkin: <https://orcid.org/0000-0002-9400-1826>
 Л.Е. Сорокина / L.E. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-1862-6816>
 А.В. Серебрякова / A.V. Serebryakova: <https://orcid.org/0000-0002-1048-5158>
 К.А. Алиев / K.A. Aliyev: <https://orcid.org/0000-0003-3911-1245>
 П.Е. Максимова / P.E. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0001-5920-8664>
 А.Э. Лазарев / A.E. Lazarev: <https://orcid.org/0000-0003-2684-3834>
 А.И. Балакчина / A.I. Balakchina: <https://orcid.org/0000-0001-6239-885X>
 И.О. Головкин / I.O. Golovkin: <https://orcid.org/0000-0002-3578-5130>

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (государственное задание № FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии»).

Funding. The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russia (State Assignment No. FZEG-2023-0009 “Study of the heterogeneity of the tumor microenvironment as a factor in its aggressiveness and resistance to therapy”).

Статья поступила: 23.05.2023. **Принята к публикации:** 22.09.2023.

Article submitted: 23.05.2023. **Accepted for publication:** 22.09.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-21-30>

Взаимосвязь транспозонов с длинными некодирующими РНК и пептидами в канцерогенезе

Р.Н. Мустафин

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

Контакты: Рустам Наилевич Мустафин ruji79@mail.ru

Доказано, что 98 % генома человека транскрибируется. Основная часть образующихся при этом молекул после их процессинга функционирует в качестве различных молекул РНК, среди которых наиболее известны длинные некодирующие РНК (днРНК) и микроРНК. У человека выявлены 126 тыс. генов днРНК, регулирующих транскрипцию, трансляцию, модификации гистонов, образование гетерохроматина, сплайсинг, экспрессию и формирование микроРНК, а также посттранскрипционные модификации матричной РНК (мРНК). Важным свойством днРНК является взаимо- и саморегуляция образующимися при их трансляции пептидами, которые влияют также на экспрессию белок-кодирующих генов. Данное свойство может быть обусловлено происхождением днРНК от транспозонов и представляет собой консервативную эволюционную характеристику днРНК как одно из свойств при образовании новых генов для изменчивости и адаптации. Доказана роль возникших от ретроэлементов днРНК и образуемых при их процессинге микроРНК в специфической регуляции генов, участвующих в канцерогенезе. Образующие при трансляции днРНК пептиды могут быть использованы как универсальные инструменты для таргетной терапии злокачественных новообразований. Анализ научной литературы позволил описать 21 днРНК, которая транслируется с образованием пептидов, вовлеченных в патогенез специфических опухолей. Поскольку способность днРНК к саморегуляции продуктами собственной трансляции, которая характерна для всех днРНК, является также свойством транспозонов, перспективно исследование мобильных генетических элементов и их взаимосвязи с днРНК для проектирования новых терапевтических моделей.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК, злокачественные новообразования, канцерогенез, микроРНК, транспозоны, ретроэлементы

Для цитирования: Мустафин Р.Н. Взаимосвязь транспозонов с длинными некодирующими РНК и пептидами в канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):21–30. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-21-30>

Relationship of transposable elements with long non-coding RNAs and peptides in carcinogenesis

R. N. Mustafin

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

Contacts: Rustam Nailevich Mustafin ruji79@mail.ru

It has been proven that 98 % of the human genome is transcribed. The main part of resulting molecules after their processing function as various RNA molecules, among which the best known are long noncoding RNA (lncRNA) and microRNA. There are 126,000 lncRNA genes in humans that regulate transcription, translation, histone modifications, heterochromatin formation, splicing, microRNA expression and formation, and matrix RNA (mRNA) post-transcriptional modifications. An important property of lncRNAs is their mutual and self-regulation by peptides formed during their translation, which also affect the expression of protein-coding genes. This property may be due to origin of lncRNAs from transposable elements and is a conservative evolutionary characteristic of lncRNA, as one of properties in formation of new genes for variability and adaptation. The role of lncRNAs originating from retroelements and microRNAs formed during their processing in the specific regulation of genes involved in carcinogenesis has been proven. The peptides formed during lncRNA translation can be used as universal tools for targeted therapy of malignant neoplasms. Analysis of the scientific literature made it possible to describe 21 lncRNAs that are translated to form peptides involved in specific tumors pathogenesis. Since the ability of lncRNA to self-regulate by products of its own translation, which is characteristic of all lncRNAs, is also a property of transposable elements, it is promising to study transposons and their relationship with lncRNAs for designing new therapeutic models.

Keywords: long non-coding RNAs, malignant neoplasms, carcinogenesis, miRNAs, transposons, retroelements

For citation: Mustafin R.N. Relationship of transposable elements with long non-coding RNAs and peptides in carcinogenesis. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10 (4):21–30. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-21-30>

ВВЕДЕНИЕ

Исследования в рамках современных проектов Functional Annotation of the Mammalian Genome (FANTOM) и Encyclopedia of DNA elements (ENCODE) показали, что около 98 % генома человека транскрибируется. Однако экзоны белок-кодирующих генов (БКГ) составляют не более 1,5 % всей хромосомной ДНК. Большая часть транскриптов аннотируются как некодирующие РНК (нкРНК), подразделяющиеся на малые нкРНК с длиной зрелых молекул 20–30 нуклеотидов (микроРНК, piРНК, siРНК) и длинные нкРНК (днРНК), которые состоят из 200 и более нуклеотидов [1]. В геноме человека на 2022 г. аннотированы 126 000 генов днРНК (по базе данных NONCODEv4), что значительно превышает количество БКГ [2]. В то же время около 69 % генома человека состоит из мобильных генетических элементов (МГЭ) и их фрагментов [3], часть из которых в эволюции стали источником отдельных днРНК [4].

Для злокачественных новообразований (ЗНО) характерны особенности экспрессии днРНК [5], что может отражать активацию в них МГЭ [6] в связи с ключевой ролью последних в образовании и регуляции нкРНК. Анализ результатов секвенирования молекул РНК и базы данных GENCODE показал, что 83 % всех известных днРНК содержат остатки МГЭ, которые занимают в среднем не менее 41 % их нуклеотидных последовательностей [4]. Интроны БКГ, которые в эволюции также произошли от МГЭ, составляют 25 % генома человека [7]. Мобильные генетические элементы являются ключевыми регуляторами онтогенетического развития, поскольку необходимы для пространственной и временной дифференцировки клеток, начиная с эмбриогенеза, что отражается на регуляторной роли происходящих от них нкРНК [8].

Мобильные генетические элементы классифицируют на ДНК-транспозоны (перемещающиеся путем вырезания и вставки) и ретроэлементы (РЭ). Механизм мобилизации РЭ связан со встраиванием в новый локус генома с помощью эндонуклеазы образованных из их транскриптов (с помощью обратной транскриптазы) молекул комплементарной ДНК (кДНК). Ретроэлементы, кодирующие собственные ферменты, необходимые для обратной транскрипции и интеграции, называют автономными. К ним относятся содержащие длинные концевые повторы (long terminal repeats, LTRs) РЭ и non-LTR РЭ (LINE). Ретроэлементы, содержащие длинные концевые повторы, являются эндогенными ретровирусами человека (HERV) и занимают 8 % генома человека [6]; более 17 % составляют LINE-1 (около 500 000 копий) [9]. К неавтономным non-LTR РЭ относятся SINE (11 % генома) и SVA

(SINE, VNTR, Alu). Системный обзор данных научной литературы показал, что МГЭ играют ключевую роль в развитии ЗНО, являясь инициаторами канцерогенеза [6]. Метаанализы показали гипометилирование LINE-1 (наиболее значительное при раке желудка и колоректальном раке) [10] и Alu-элементов [11] в тканях различных ЗНО по сравнению с нормальными, неопухолевыми тканями.

При исследовании 7769 образцов различных ЗНО, принадлежащих к 15 типам ЗНО, выявлена активация РЭ в большинстве из них (до 87 % случаев). При этом наблюдалась стимуляция экспрессии онкогенов под влиянием промоторов LINE-1 и HERV [12]. Анализ активности LINE-1 в 2954 образцах различных опухолей позволил выявить соматические транспозиции в 35 % из них [13]. Секвенирование РНК из образцов рака простаты, молочной железы (PMЖ) и ободочной кишки показало локус-специфическую экспрессию 155 различных HERV по сравнению с нормальными тканями, а также в зависимости от типа ЗНО [14]. Приведенные данные свидетельствуют о важной роли МГЭ в развитии новообразований. Кроме того, в ходе анализа активности LINE-1 в 3620 образцах колоректального рака выявлена достоверная положительная корреляция с выживаемостью пациентов [9], что свидетельствует о возможном влиянии этого фактора на эффективность проводимой химиотерапии и агрессивность опухоли. Поэтому исследование особенностей активации МГЭ в различных ЗНО может стать основой как для прогноза, так и для разработки таргетной терапии. Поскольку МГЭ не только являются основными эволюционными источниками большинства днРНК (в результате их инактивации и одомашнивания для нужд генома хозяина) [4], но и могут служить непосредственными генами днРНК (функционирование одновременно в качестве эндогенных ретровирусов сочетается с процессированием их транскриптов в днРНК) [15], исследование днРНК позволит определить роль МГЭ в канцерогенезе.

На примере клеточной линии рака легкого было показано, что днРНК способны к трансляции с образованием функциональных пептидов, также вовлеченных в развитие специфических ЗНО [16]. Их исследование является перспективным направлением для разработки эффективной таргетной терапии опухолей. Гены днРНК распределены по всему геному человека не только в межгенных локусах ДНК и интронах, но и в областях промоторов БКГ и псевдогенах [17], в возникновении которых ключевую роль играют МГЭ [18]. Кроме того, уникальной характеристикой днРНК является транскрипция с антисмысловой цепи ДНК БКГ. Несмотря на происхождение от РЭ,

изменчивость и эволюционирование генов днРНК происходят за счет инсерций в них кДНК-неавтономных РЭ Алу, транскрипты которых придают молекулам зрелых днРНК новые функции за счет несовершенных спариваний оснований с матричными РНК (мРНК) генов [19].

РОЛЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Несмотря на наличие большого количества генов днРНК, изменение экспрессии одной специфической днРНК может оказывать значительное воздействие на развитие ЗНО [20]. Это обусловлено тканеспецифичностью транскрипции днРНК и их плейотропным действием [5]. Так, ингибирование днРНК MALAT1 вызывает активацию транскрипционного фактора p53 и подавление экспрессии онкогенного транскрипционного фактора В-МЫВ (необходим для перехода из фазы G2 в фазу М), что приводит к остановке клеточного цикла и уменьшению размера опухоли [20]. Профилирование транскриптомов различных ЗНО в 2011 г. показало большое количество ассоциированных с опухолями днРНК: ANRIL, anti-NOS2A, BC200, BIC/MIRHG155/MIRHG2, DD3/PCA3, GAS5/SNHG2, HOTAIR, HULC, H19, LOC285194, MALAT1/α/NEAT2, MEG3, ncRAN, PCGEM1, PRNCR1, PTENP1, SRA-1/SRA, TUC338, UCA1/CUDR, uc.73A [5].

Длинные некодирующие РНК могут формировать специфические трехмерные структуры, способные связываться с определенными последовательностями ДНК [2], что, вероятно, отражает свойство МГЭ выступать в качестве источников возникновения жизни и ее эволюции за счет взаиморегуляции РНК и ДНК [8]. Длинные некодирующие РНК используются в качестве гидов для специфического метилирования ДНК (днРНК Airn, eсCEBP, H19, Kcnq1ot1, PAPAS, рRNA, PTENp1-AS, TARID, Xist) и модификаций гистонов (ANRASSF1, ANRIL, BORDERLINE, Kcnq1ot1, NeST, PINT). Они регулируют экспрессию БКГ за счет взаимодействий с транскрипционными факторами (AK141205, AK028326, ES1, ES2, ES3, linc-RoR, Evx1as, Nohb5/bas) и за счет транспорта мРНК путем их редактирования (ALU-РНК) [17]. Подобно микроРНК, днРНК участвуют в антисмысловой интерференции для кодирующих мРНК, подавляя (Uchl1-as1) или стимулируя (lincMD1, lincRNA-p21, 1/2-sbsRNA) трансляцию [1, 2, 17].

Ключевая роль МГЭ в формировании генов днРНК в эволюции [4], а также функционирование транскриптов МГЭ в качестве днРНК [15] свидетельствуют о значении днРНК в канцерогенезе, драйверами которого являются сами МГЭ [6]. Действительно, получен ряд доказательств непосредственного участия возникших от МГЭ днРНК в развитии специфических ЗНО. Было продемонстрировано, что происходящая от HERV днРНК TROJAN способствует прогрессированию трижды негативного РМЖ за счет разрушения

фактора репрессии метастазов ZMYND8 [21]. От LTR-РЭ произошла lncMER52A, которая стимулирует развитие гепатоцеллюлярной карциномы путем взаимодействия с p120-катенином [22]. В эволюции ERV встраивались в область HLA-B между генами MICA и MICB и стали основой для возникновения гена днРНК HCP5, который участвует в канцерогенезе и развитии аутоиммунной патологии [23]. Произошедшая от HERV днРНК PRLH1, вовлеченная в гомологичную рекомбинацию, стимулирует пролиферацию клеток рака печени [24].

ВЗАИМОСВЯЗЬ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК С МИКРОРНК И ТРАНСПОЗОМАМИ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Помимо множества вышеперечисленных функций, днРНК могут взаимодействовать с микроРНК в качестве приманок (губок) для их инактивации [2] или предшественников микроРНК [1] (см. рисунок). Многие участвующие в канцерогенезе микроРНК закодированы в генах днРНК [25]. Так, у человека из днРНК MIR155HG процессируется онкогенная pri-miRNA-155 [26], которая транслируется в пептид miPEP155 из 17 аминокислот (подавляет аутоиммунное воспаление путем регуляции транспорта и презентации антигенов в антигенпрезентирующих клетках) [27]. В патогенезе РМЖ участвуют днРНК LOC554202 (предшественник miR-31) [28] и днРНК H19 (предшественник miR-675) [29]. Длинная некодирующая РНК MIR497HG транскрибируется в pri-miR-497, которая процессируется в 2 зрелые микроРНК: miR-497 и miR-195. При этом pri-miR-497 транслируется в пептид miPEP497 с онкосупрессорной функцией [25].

Роль днРНК в качестве губок для микроРНК (конкурентных эндогенных РНК (кэРНК)) может свидетельствовать о происхождении микроРНК и днРНК от мобильных генетических элементов, поскольку для МГЭ характерна саморегуляция как собственными процессированными транскриптами, так и продуктами трансляции [8]. Примером общего происхождения днРНК и микроРНК от единого источника является днРНК UCA1, которая подавляет экспрессию miR-193a-3p (за счет наличия комплементарных нуклеотидных последовательностей), повышая уровни гена-мишени *ERBB4* этой микроРНК при немелкоклеточном раке легкого [30]. Другие некодирующие РНК также могут иметь общее происхождение с микроРНК. Так, кольцевая РНК circCCDC66, способствующая прогрессированию рака ободочной кишки, служит губкой для miR-670 и miR-4326 [31]. Длинная некодирующая РНК cSMARCA5, подавляющая рост гепатоцеллюлярной карциномы, является губкой для miR-17-3p и miR-181b-5p [32].

Длинные некодирующие РНК в качестве кэРНК хорошо изучены на примере РМЖ: днРНК linc-ROR специфически гиперэкспрессируется в тканях опухоли как кэРНК для miR-205, предотвращая разрушение

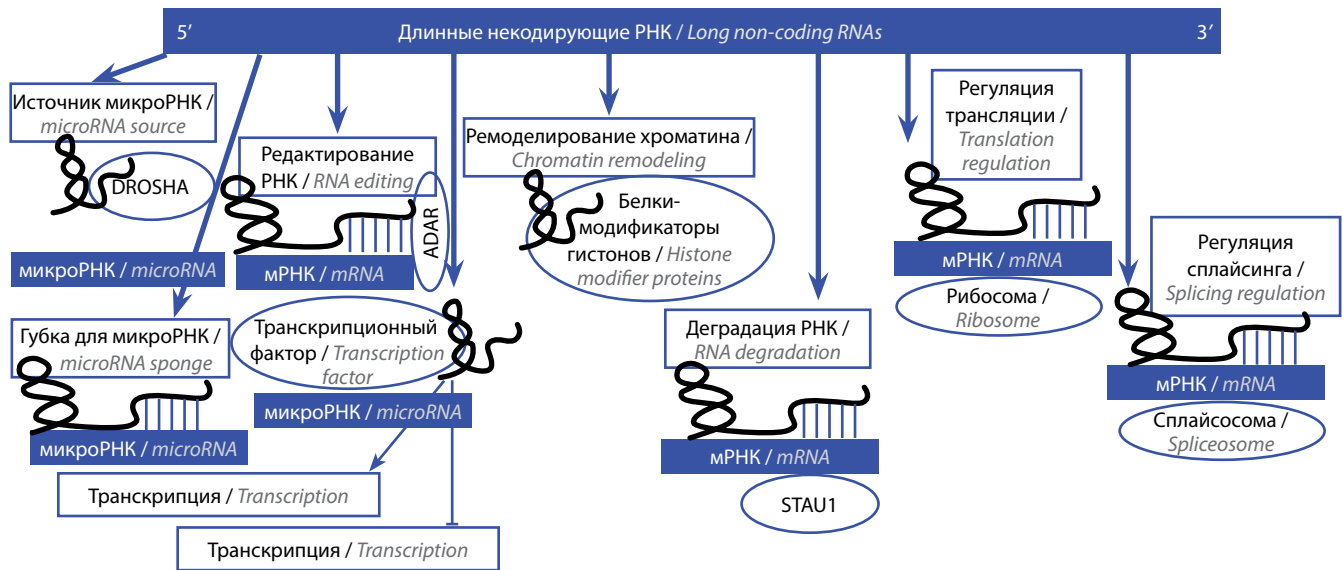


Схема функционирования длинных некодирующих РНК. мРНК – матричная РНК
Scheme of long non-coding RNAs functioning. mRNA – matrix RNA

мРНК генов гомеобоксов 1 и 2, связывающих E-бокс цинкового пальца ZEB1 и ZEB2 (zinc finger E-box-binding homeobox 1 and 2). Белковые продукты этих генов являются транскрипционными факторами, которые индуцируют эпителиально-мезенхимальный переход, необходимый для прогрессирования РМЖ [33]. NEAT1 является кэРНК для miR-448 (повышая уровень ее мишени ZEB1) [34]; MALAT способствует метастазированию РМЖ за счет воздействия на miR-1, что стимулирует экспрессию генов *Slug* и виментина [35]; lincK стимулирует ZEB1 путем конкурентного связывания с miR-200 [36]; LSINCT5 воздействует на пути Wnt, являясь губкой для miR-30a [37]. Прогрессирование рака желудка положительно коррелирует с низким уровнем экспрессии LINC01133, которая является кэРНК для miR-106a-3p [38].

Длинная некодирующая РНК MIAT способствует прогрессированию рака щитовидной железы в качестве кэРНК для miR-150-5p (мишень – EZH2 [39]); RHPN1-AS1 препятствует апоптозу рака простаты, являясь губкой для miR-7-5p и активируя экспрессию EGFR [40]; MIR210HG вызывает прогрессирование глиомы, функционируя как кэРНК для miR-377-3p и ингибируя транскрипцию LMX1A (LIM homeobox transcription factor 1) – транскрипционного фактора, который связывается с AT-богатыми повторами нуклеотидов в промоторной области инсулина, стимулируя его экспрессию [41]. LINC00936 подавляет развитие рака яичника путем комплементарного взаимодействия с miR-221-3p и контроля экспрессии LAMA3 [42]. В табл. 1 представлены обобщенные сведения о роли днРНК в качестве кэРНК для микроРНК в канцерогенезе различных типов опухолей. Приведенные данные могут стать основой для таргетной терапии ЗНО, как было показано на примере ингибирования MALAT1 [35] и NEAT1 [34] при РМЖ.

В эволюции источниками генов всех днРНК могли быть МГЭ, которые в результате накопления мутаций под влиянием отбора с обретением новых адаптивных регуляторных свойств стали использоваться для новых функций хозяев. Многие зрелые днРНК идентичны последовательностям МГЭ [43]. В среднем для 41 % экзонов днРНК доказано происхождение от транспозонов, а 83 % из них содержат хотя бы один фрагмент МГЭ. Это дает основу для формирования функциональных доменов молекул РНК, участвующих в разнообразных биологических реакциях. Помимо участия в структурных конфигурациях зрелых транскриптов, МГЭ образуют сайты полиаденилирования, промоторы, донорные и акцепторные сайты сплайсинга [44]. Отдельные семейства МГЭ наиболее часто встречаются в генах lincRNA. Характерны также межвидовые различия состава МГЭ в генах lincRNA, что может быть связано с особенностями распределения МГЭ в этих геномах [45]. Одним из подтверждений вероятного происхождения всех днРНК от транспозонов являются данные о непосредственной роли МГЭ (без накопления мутаций и полной инактивации) в регуляции экспрессии генов. Например, HERV функционируют в качестве ядерных днРНК, необходимых для поддержания идентичности эмбриональных стволовых клеток человека [15]. При процессинге транскриптов отдельных МГЭ могут образовываться днРНК, влияющие на образование гетерохроматина и экспрессию специфических БКГ [46]. Несмотря на то что гены днРНК в эволюции произошли главным образом от МГЭ, они имеют общие черты с БКГ, поскольку транскрибируются РНК-полимеразой II с последующим кэпированием и сплайсингом [2]. Это может свидетельствовать о вероятной роли МГЭ в происхождении некоторых БКГ, о чем получены достоверные свидетельства [18]. Одним из возможных доказательств

Таблица 1. Длинные некодирующие РНК в качестве конкурентных эндогенных РНК для микроРНК в канцерогенезе**Table 1.** Long non-coding RNAs as competitive endogenous RNAs for miRNAs in carcinogenesis

| днРНК (кэРНК) lncRNA (ceRNA) | микроРНК miRNA | Тип опухоли Tumor type | Год описания, автор Descriptions year, author |
|---------------------------------|-------------------|--|--|
| linc-ROR | miR-205 | Рак молочной железы Breast cancer | 2014, [33] |
| MALAT1 | miR-1 | Рак молочной железы Breast cancer | 2016, [35] |
| UCA1 | miR-193a-3p | Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer | 2016, [30] |
| circCCDC66 | miR-670 | Рак ободочной кишки Colon cancer | 2017, [31] |
| | miR-4326 | | |
| cSMARCA5 | miR-17-3p | Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma | 2018, [32] |
| | miR-181b-5p | | |
| NEAT1 | miR-448 | Рак молочной железы Breast cancer | 2018, [34] |
| LINC01133 | miR-106a-3p | Рак желудка Stomach cancer | 2018, [38] |
| lincK | miR-200 | Рак молочной железы Breast cancer | 2019, [36] |
| LSINCT5 | miR-30a | Рак молочной железы Breast cancer | 2020, [37] |
| MIAT | miR-150-5p | Рак щитовидной железы Thyroid cancer | 2021, [39] |
| RHPN1-AS1 | miR-7-5p | Рак простаты Prostate cancer | 2022, [40] |
| MIR210HG | miR-377-3p | Глиома Glioma | 2022, [41] |
| LINC00936 | miR-221-3p | Рак яичника Ovarian cancer | 2023, [42] |

роли МГЭ в происхождении генов днРНК являются характерные для них эпигенетические метки: метилирование CpG-островков, ацетилирование лизина в 4, 9 и 36-м в положениях гистона 3 (H3K4, H3K9, H3K36), транскрипционная регуляция факторами Nanog, Oct, p53 [1].

В эволюции гены сплайсосомных интронов и белков сплайсосомы произошли от МГЭ [7], которые также являются источниками транскрипции длинных интронных и кольцевых днРНК [17]. Вышеперечисленные факты также являются свидетельствами ключевой роли МГЭ в возникновении днРНК. Поскольку дисрегуляция МГЭ представляет собой важный фактор развития ЗНО [6], исследование днРНК может стать основой для разработки эффективной терапии, направленной на нормализацию нарушенной экспрессии МГЭ. Необходимо отметить, что, несмотря на свое название («длинные некодирующие РНК»), днРНК обладают потенциалом транслироваться на рибосо-

мах с образованием функциональных пептидов [47], и наиболее удобными молекулами воздействия на днРНК и МГЭ могут стать образуемые при трансляции днРНК пептиды.

ТРАНСЛЯЦИЯ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Классические открытые рамки считывания (open reading frames, ORF), кодирующие белки или пептиды, характеризуются наличием стартового кодона (AUG) и длиной более 300 п. н. Поэтому долгое время считалось, что нкРНК, в которых отсутствует стартовый кодон и длина которых не превышает 300 п.н., не транслируются. Благодаря достижениям в профилировании рибосом, технологиям секвенирования и протеомным методикам, появляется все больше данных о роли нкРНК в качестве источников белков и пептидов. Для этого используются программы: калькулятор кодирующего потенциала (CPC2), ORFscore,

ORF-RATER, sORF finder, а также COME (coding potential calculation tool), RNACode, PhyloCSF, PORTRAIT, CPAT. Взаимосвязь нкРНК с рибосомами определяют с помощью PROTEOFORMER, ORF classifier, RibORF, RiboTaper [47]. Еще в 2008 г. был описан пептид, состоящий из 39 аминокислот, названный MEOLE-1 и синтезируемый из днРНК MEOLE в клетках меланомы. Особенностью этой днРНК оказалось наличие нескольких ORF [48], в связи с чем в последующие годы охарактеризованы пептиды MEOLE-2 (44 аминокислоты) и MEOLE-3 (54 аминокислоты), транслируемые из этой днРНК, в зависимости от расположения последовательностей внутренних сайтов входа в рибосому [49].

В 2015 г. был описан ген *CRNDE*, характеризующийся усиленной транскрипцией в тканях колоректального рака. Образованная при этом днРНК транслировалась в пептид из 84 аминокислот, локализованный преимущественно в ядре [50]. В ходе исследований 2017 г. у человека были выявлены miPEP-200a и miPEP-200b, ингибирующие эпителиально-мезенхимальный переход, за счет чего они подавляют миграцию клеток рака простаты [51]. В 2019 г. полноразмерное транслирующее секвенирование молекул мРНК с профилированием рибосом позволило определить 308 полипептидов, которые транслируются из специфических днРНК. При этом для 3330 днРНК показана способность активно связываться с рибосомами [16].

На примере miPEP133 (состоит из 133 аминокислот) продемонстрирована саморегуляция пептидов путем взаимодействия с онкосупрессорами в канцерогенезе: в линии клеток рака носоглотки активация p53 приводит к гиперэкспрессии ргi-miR-34a и образованию miPEP133, который стимулирует транскрипцию гена *TP53* [52]. Поскольку белок p53 имеет важнейшее значение в подавлении развития большинства опухолей, исследование подобных механизмов перспективно для таргетной терапии ЗНО. Не исключена взаимосвязь и других генов-онкосупрессоров со специфическими микроРНК, что может отражать их происхождение от МГЭ. Эти микроРНК характеризуются саморегуляцией с транспозонами, поскольку МГЭ влияют на онкогены и онкосупрессоры [6]. Длинная некодирующая РНК MIR497HG транслируется в пептид miPEP497, состоящий из 21 аминокислоты, который подавляет рост клеток рака шейки матки за счет ингибирования генов *CDC25A*, *CDK6*, *Cyclin E* [25]. В 2017 г. описан кодируемый днРНК *HOXB-AS3* консервативный пептид длиной 53 аминокислоты, ингибирующий рост рака ободочной кишки за счет репрограммирования метаболизма и изменения сплайсинга мРНК гена пируваткиназы М [53]. В том же году экспериментально охарактеризован пептид из 68 аминокислот, транслируемый из LINC01420 в клетках лейкоза и РМЖ [54].

В 2018 г. определен пептид PINT (p53-induced transcript) длиной 87 аминокислот, кодируемый кольцевой

днРНК и подавляющий пролиферацию клеток глиобластомы *in vitro* и *in vivo* [55]. Кольцевая днРНК SHPRH (SNF2 histone linker PHD RING helicase) транслируется в белок длиной 146 аминокислот, ингибирующий пролиферацию клеток глиобластомы [56]. При трансляции circ-FBXW7 (в норме высоко экспрессируется в головном мозге) образуется белок длиной 185 аминокислот, ингибирующий глиобластому [57], а также трижды негативный РМЖ [58]. В образцах ткани рака мочевого пузыря выявлен повышенный уровень circ-Gprc5a, транслируемого в пептид из 11 аминокислот (способствует прогрессированию данного ЗНО) [59]. При раке толстой кишки определяется экспрессия circ-PPP1R12A, транслируемого в пептид из 73 аминокислот (стимулирует рост опухоли) [60] и circ-FNDC3B, транслируемого в белок из 218 аминокислот (подавляет рост опухоли) [61]. Клетки гепатоцеллюлярной карциномы вырабатывают circ-β-catenin, транслируемый в белок из 370 аминокислот, который способствует развитию опухоли [62]. В клетках рака легкого вырабатывается днРНК UBAP1-AST6 с онкогенными свойствами, транслируемая в одноименный белок [16].

В 2020 г. в тканях трижды негативного РМЖ выявлен пептид CIP2A-VP из 52 аминокислот, образующийся при трансляции LINC00665 [63], а также пептид ASRPS из 60 аминокислот (транслируется из LINC00908) [64]. Оба пептида ингибировали развитие трижды негативного РМЖ. В том же году обнаружены днРНК LOC90024 (транслируется в белок длиной 130 аминокислот) [65] и LINC-00266-1 (пептид RBRP из 71 аминокислот) стимулирующие прогрессирование колоректального рака [66], LINC00998 (транслируется в пептид SMIM30 из 59 аминокислот, активирующий рост гепатоцеллюлярной карциномы) [67]. В табл. 2 представлены данные о транслируемых нкРНК, вовлеченных в развитие специфических ЗНО. Пептиды, участвующие в канцерогенезе, могут быть использованы в комплексе с микроРНК (или их имитаторами) для доставки в определенные ткани с возможностью мониторинга в реальном времени биологических функций. Так, еще в 2018 г. была описана эффективная целевая доставка в ткань опухоли и клетки HeLa самособирающегося наноконструкта, образованного миметиками микроРНК (онкосупрессорная miR-34a) с функциональным пептидным конъюгатом (FA-R9-FPcas3). В результате индуцировался апоптоз клеток HeLa и подавлялся рост опухоли в эксперименте на живых мышах [68].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определенных типов опухолей характерна экспрессия специфических нкРНК, одной из причин которой может служить патологическая активация РЭ, участвующих в канцерогенезе, что, вероятно, обусловлено эволюционным происхождением некоторых генов нкРНК от транспозонов и непосредственным

Таблица 2. Некодирующие РНК, транслируемые в пептиды, участвующие в канцерогенезе

Table 2. Non-coding RNAs translated into peptides involved in carcinogenesis

| Название некодирующей РНК Non-coding RNA name | Длина пептида (метод обнаружения) Peptide length (detection method) | Воздействие на опухоль Effect on the tumor | Год описания, автор Year of description, author |
|--|--|--|--|
| MELOE-1 | 39 (<i>in vivo</i>) | Стимулирует меланому Stimulates melanoma | 2008, [48] |
| CRNDE | 84 (<i>in vitro</i>) | Стимулирует колоректальный рак Stimulates colorectal cancer | 2015, [50] |
| MEOLE-2 | 44 (<i>in vitro</i>) | Стимулирует меланому Stimulates melanoma | 2016, [49] |
| MEOLE-3 | 54 (<i>in vitro</i>) | Стимулирует меланому Stimulates melanoma | 2016, [49] |
| LINC01420 | 68 (<i>in vitro</i>) | Стимулирует клетки лейкоза и рака молочной железы Stimulates leukemia and breast cancer | 2017, [54] |
| pri-miR-200a | 187 (<i>in vitro</i>) | Ингибирует рак простаты Inhibits prostate cancer | 2017, [51] |
| pri-miR-200b | 54 (<i>in vitro</i>) | Ингибирует рак простаты Inhibits prostate cancer | 2017, [51] |
| HOXB-AS3 | 53 (<i>in vivo</i>) | Ингибирует рак ободочной кишки Inhibits colon cancer | 2017, [53] |
| Circ-Gprc5a | 11 (<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>) 11 (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>) | Стимулирует рак мочевого пузыря Stimulates bladder cancer | 2018, [59] |
| PINT | 87 (<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>) 87 (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>) | Ингибирует глиобластому Inhibits glioblastoma | 2018, [55] |
| SHPRH | 146 (<i>in vitro</i>) | Ингибирует глиобластому Inhibits glioblastoma | 2018, [56] |
| circ-FBXW7 | 185 (<i>in vivo</i>) | Ингибирует глиобластому Inhibits glioblastoma | 2018, [57] |
| | | Ингибирует рак молочной железы Inhibits breast cancer | 2019, [58] |
| circ-PPP1R12A | 73 (<i>in vivo</i>) | Стимулирует рак толстой кишки Stimulates colon cancer | 2019, [60] |
| circ- β -catenin | 370 (<i>in vitro</i>) | Стимулирует рак печени Stimulates liver cancer | 2019, [62] |
| UBAP1-AST6 | – (<i>in vitro</i>) | Стимулирует клетки рака легкого Stimulates lung cancer cells | 2019, [16] |
| pri-miR-34a | 133 (<i>in vivo</i>) | Ингибирует рак носоглотки Inhibits nasopharyngeal cancer | 2020, [52] |
| circ-FNDC3B | 218 (<i>in vivo</i>) | Ингибирует рак толстой кишки Inhibits colon cancer | 2020, [61] |
| LINC00665 | 52 (<i>in vitro</i>) | Ингибирует рак молочной железы Inhibits breast cancer | 2020, [63] |
| LOC90024 | 130 (<i>in vivo</i>) | Стимулирует колоректальный рак Stimulates colorectal cancer | 2020, [65]. |
| LINC00998 | 59 (<i>in vitro</i>) | Стимулирует гепатоцеллюлярную карциному Stimulates hepatocellular carcinoma | 2020, [67] |
| LINC00908 | 60 (<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>) 60 (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>) | Ингибирует трижды негативный рак молочной железы Inhibits triple negative breast cancer | 2020, [64] |
| LINC-00266-1 | 71 (<i>in vivo</i>) | Стимулирует колоректальный рак Stimulates colorectal cancer | 2020, [66] |
| MIR497HG | 21 (<i>in vitro</i>) | Ингибирует рак шейки матки Inhibits cervical cancer | 2021, [25] |

процессингом транскриптов РЭ с образованием молекул днРНК. Последние могут быть предшественниками или губками для микроРНК, вовлеченных в механизмы развития опухоли. Данные взаимосвязи могут стать основой для разработки таргетной терапии специфических ЗНО с использованием в качестве мишеней РЭ, днРНК и микроРНК. Перспективным направлением является применение пептидов, образуемых при трансляции нкРНК. Анализ научной литературы позволил выявить 21 специфический пеп-

тид, вовлеченный в пути канцерогенеза, транслируемый из нкРНК и характерный для определенных опухолей, что может стать основой для таргетной терапии ЗНО. О перспективах воздействия на РЭ свидетельствует эффективность ингибирования обратной транскриптазы, кодируемой LINE-1, за счет подавления прогрессирования ЗНО с восстановлением дифференцировки опухолевых клеток и репрограммированием глобального транскрипционного профиля [9].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kour S., Rath P.C. Long noncoding RNAs in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2016;26:1–21. DOI: 10.1016/j.arr.2015.12.001
- Fico A., Fiorenzano A., Pascale E. et al. Long non-coding RNA in stem cell pluripotency and lineage commitment: functions and evolutionary conservation. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:1459–71. DOI: 10.1007/s00018-018-3000-z
- De Koning A.P., Gu W., Castoe T.A. et al. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genetics* 2011;7(12):e1002384. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002384
- Kelley D., Rinn J. Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biol* 2012;13(11):R107. DOI: 10.1186/gb-2012-13-11-r107
- Gibb E.A., Brown C.J., Lam W.L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer* 2011;10:38. DOI: 10.1186/1476-4598-10-38
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Роль ретроэлементов в развитии наследственных опухолевых синдромов. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(4):42–52. DOI: 2313-805X-2021-8-4-42-52
Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of retroelements in the development of hereditary tumor syndromes. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021; 8(4):42–52. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-4-42-52
- Haack D.B., Toor N. Retroelement origins of pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2020;11(4):e1589. DOI: 10.1002/wrna.1589
- Мустафин Р.Н. Функциональный дуализм транскриптов транспозонов в эволюции эукариотических геномов. *Онтогенез* 2018;4S1:3–20.
Mustafin R.N. Functional dualism of transposon transcripts in the evolution of eukaryotic genomes. *Ontogenesis* 2018;4S1:3–20. (In Russ.).
- Ye D., Jiang D., Li Y. et al. The role of LINE-1 methylation in predicting survival among colorectal cancer patients: a meta-analysis. *Int J Clin Oncol* 2017;22(4):749–57. DOI: 10.1007/s10147-017-1106-1
- Barchitta M., Quattrocchi A., Maugeri A. et al. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(10):e109478. DOI: 10.1371/journal.pone.0109478
- Ye D., Jiang D., Zhang X., Mao Y. Alu methylation and risk of cancer: a meta-analysis. *Am J Med Sci* 2020;359(5):271–80. DOI: 10.1016/j.amjms.2020.03.002
- Jang H.S., Shah N.M., Du A.Y. et al. Transposable elements drive widespread expression of oncogenes in human cancer. *Nat Genet* 2019;51(4):611–7. DOI: 10.1038/s41588-019-0373-3
- Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet* 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0
- Steiner M.C., Marston J.L., Iniguez L.P. et al. Locus-specific characterization of human endogenous retrovirus expression in prostate, breast, and colon cancers. *Cancer Res* 2021;81(13):3449–60. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3975
- Lu X., Sachs F., Ramsay L. et al. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat Struct Mol Biol* 2014;21(4):423–5. DOI: 10.1038/nsmb.2799
- Lu S., Zhang J., Lian X. et al. A hidden human proteome encoded by 'non-coding' genes. *Nucleic Acids Res* 2019;47(15):8111–25. DOI: 10.1093/nar/gkz646
- Grammatikakis I., Panda A.C., Abdelmohsen K., Gorospe M. Long noncoding RNAs (lncRNAs) and the molecular hallmarks of aging. *Aging (Albany NY)* 2014;6(12):992–1009. DOI: 10.18632/aging.100710
- Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* 2008;9(5):397–405. DOI: 10.1038/nrg2337
- Hadijargyrou M., Delihis N. The intertwining of transposable elements and non-coding RNAs. *Int J Mol Sci* 2013;14(7):13307–28.
- Abdelmohsen K., Gorospe M. Noncoding RNA control of cellular senescence. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2015;6(6):615–29.
- Jin X., Xu X., Jiang Y. et al. The endogenous retrovirus-derived long noncoding RNA TROJAN promotes triple-negative breast cancer progression via ZMYND8 degradation. *Sci Adv* 2019;5(3):eaat9820. DOI: 10.1126/sciadv.aat9820
- Wu Y., Zhao Y., Huan L. et al. An LTR retrotransposon-derived long noncoding RNA lncMER52A promotes hepatocellular carcinoma progression by binding p120-Catenin. *Cancer Res* 2020;80(5):976–87. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2115
- Kulski J.K. Long noncoding RNA HCP5, a hybrid HLA class I endogenous retroviral gene: structure, expression, and disease associations. *Cells* 2019;8(5):480. DOI: 10.3390/cells8050480
- Deng B., Xu W., Wang Z. et al. An LTR retrotransposon-derived lncRNA interacts with RNF169 to promote homologous recombination. *EMBO Rep* 2019;20(11):e47650. DOI: 10.15252/embr.201847650
- Prel A., Dozier C., Combier J.P. et al. Evidence that regulation of Pri-miRNA/miRNA expression is not a general rule of miPEPs function in humans. *Int J Mol Sci* 2021;22(7):3432. DOI: 10.3390/ijms22073432
- Testa U., Pelosi E., Castelli G., Labbaye C. miR-146 and miR-155: two key modulators of immune response and tumor development. *Noncoding RNA* 2017;3(3):22. DOI: 10.3390/ncrna3030022
- Niu L., Lou F., Sun Y. et al. A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. *Sci Adv* 2020;6(21):eaaz2059. DOI: 10.1126/sciadv.aaz2059

28. Augoff K., McCue B., Plow E.F., Sossey-Alaoui K. MiR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer. *Mol Canc* 2012;11:5. DOI: 10.1186/1476-4598-11-5
29. Collette J., Le Bourhis X., Adriaenssens E. Regulation of human breast cancer by the long non-coding RNA H19. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):2319. DOI: 10.3390/ijms18112319
30. Nie W., Ge H.J., Yang X.Q. et al. LncRNA-UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p. *Cancer Lett* 2016;371(1):99–106. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.11.024
31. Hsiao K.Y., Lin Y.C., Gupta S.K. et al. noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and Metastasis. *Cancer Res* 2017;77(9):2339–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1883
32. Yu J., Xu Q.G., Wang Z.G. et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2018;68(6):1214–27. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.01
33. Hou P., Zhao Y., Li Z. et al. LincRNA-ROR induces epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Cell Death Dis* 2014;5(6):e1287. DOI: 10.1038/cddis.2014.249
34. Jiang X., Zhou Y. NEAT1 contributes to breast cancer progression through modulating miR-448 and ZEB1. *J Cell Physiol* 2018;233(11):8558–66. DOI: 10.1002/jcp.26470
35. Chou J., Wang B., Zheng T. et al. MALAT1 induced migration and invasion of human breast cancer cells by competitively binding miR-1 with cdc42. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;472(1):262–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.02.102
36. Li J., Hao Y., Mao W. LincK contributes to breast tumorigenesis by promoting proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):19. DOI: 10.1186/s13045-019-0707-8
37. Zhang G., Song W. Long non-coding RNA LINC15 and Wnt/ β -catenin pathway to regulate MCF-7 cell proliferation and motility through targeting the miR-30a. *Ann Transl Med* 2020;8(24):1635. DOI: 10.21037/atm-20-7253
38. Yang X.Z., Cheng T.T., He Q.J. et al. LINC01133 as ceRNA inhibits gastric cancer progression by sponging miR-106a-3p to regulate APC expression and the Wnt/ β -catenin pathway. *Mol Cancer* 2018;17(1):126. DOI: 10.1186/s12943-018-0874-1
39. Guo K., Qian K., Shi Y. et al. LncRNA-MIAT promotes thyroid cancer progression and function as ceRNA to target EZH2 by sponging miR-150-5p. *Cell Death Dis* 2021;12(12):1097. DOI: 10.1038/s41419-021-04386-0
40. Ma X., Ren H., Zhang Y. et al. LncRNA RHPN1-AS1 inhibition induces autophagy and apoptosis in prostate cancer cells via the miR-7-5p/EGFR/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Environ Toxicol* 2022;37(12):3013–27. DOI: 10.1002/tox.23656
41. Yu Z., Che N., He Y., Zhang B. ceRNA network of lncRNA MIR210HG/miR-377-3p/LMX1A in malignant proliferation of glioma cells. *Genes Genomics* 2022;44(12):1445–55. DOI: 10.1007/s13258-022-01312-2
42. Shu C., Wang W., Wu L. et al. LINC00936/microRNA-221-3p regulates tumor progression in ovarian cancer by interacting with LAMA3. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2023;18(1):66–79. DOI: 10.2174/1574892817666220316152201
43. Kapusta A., Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implication. *Trends Genet* 2014;30(10):439–52. DOI: 10.1016/j.tig.2014.08.004
44. Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA* 2014;20(7):959–76. DOI: 10.1261/rna.044560
45. Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J. et al. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet* 2013;9(4):e1003470. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003470
46. Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE-1s in development. *Dev Cell* 2018;46(2):132–4. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.06.022
47. Zhou B., Yang H., Yang C. et al. Translation of noncoding RNAs and cancer. *Cancer Lett* 2021;497:89–99. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.10.002
48. Godet Y., Moreau-Aubry A., Guilloux Y. et al. MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency. *J Exp Med* 2008;205(11):2673–82. DOI: 10.1084/jem.20081356.
49. Charpentier M., Croyal M., Carbone D. et al. IRES-dependent translation of the long non coding RNA meloe in melanoma cells produces the most immunogenic MELOE antigens. *Oncotarget* 2016;7(37):59704–13. DOI: 10.18632/oncotarget.10923
50. Szafron L.M., Balcerak A., Grzybowska E.A. et al. The novel gene journal pre-proof 25 CRNDE encodes a nuclear peptide (CRNDEP) which is overexpressed in highly proliferating tissues. *PLoS One* 2015;10(5):e0127475. DOI: 10.1371/journal.pone.0127475
51. Fang J., Morsalin S., Rao V.N., Reddy E.S.P. Decoding of non-coding DNA and non-coding RNA: pri-micro RNA-encoded novel peptides regulate migration of cancer cells. *J Pharm Sci Pharmacol* 2017;3:23–7.
52. Kang M., Tang B., Li J. et al. Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Mol Cancer* 2020;19:143. DOI: 10.1186/s12943-020-01248-9
53. Huang J.Z., Chen M., Chen D. et al. A peptide encoded by a putative lncRNA HOXB-AS3 suppresses colon cancer growth. *Mol Cell* 2017;68(1):171–84.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.09.015
54. D’Lima N.G., Ma J., Winkler L. et al. A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex. *Nat Chem Biol* 2017;13(2):174–80. DOI: 10.1038/nchembio.2249
55. Zhang M., Zhao K., Xu X. et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun* 2018;9(1):4475. DOI: 10.1038/s41467-018-06862-2
56. Zhang M., Huang N., Yang X. et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene* 2018;37(13):1805–14. DOI: 10.1038/s41388-017-0019-9
57. Yang Y., Gao X., Zhang M. et al. Novel role of FBXW7 Circular RNA in repressing glioma tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 2018;110(3):304–15. DOI: 10.1093/jnci/djx166
58. Ye F., Gao G., Zou Y. et al. circFBXW7 inhibits malignant progression by sponging miR-197-3p and encoding a 185-aa protein in triple-negative breast cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;18:88–98. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.07.023
59. Gu C., Zhou N., Wang Z. et al. circGprc5a promoted bladder oncogenesis and metastasis through Gprc5a-targeting peptide. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018;13:633–41. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.10.008
60. Zheng X., Chen L., Zhou Y. et al. A novel protein encoded by a circular RNA circPPP1R12A promotes tumor pathogenesis and metastasis of colon cancer via Hippo-YAP signaling. *Mol Cancer* 2019;18(1):47. DOI: 10.1186/s12943-019-1010-6
61. Pan Z., Cai J., Lin J. et al. A novel protein encoded by circFNDC3B inhibits tumor progression and EMT through regulating Snail in colon cancer. *Mol Cancer* 2020;19(1):71. DOI: 10.1186/s12943-020-01179-5
62. Liang W.C., Wong C.W., Liang P.P. et al. Translation of the circular RNA circbeta-catenin promotes liver cancer cell growth through activation of the Wnt pathway. *Genome Biol* 2019;20(1):84. DOI: 10.1186/s13059-019-1685-4
63. Guo B., Wu S., Zhu X. et al. Micropeptide CIP2A-BP encoded by LINC00665 inhibits triple-negative breast cancer progression. *Embo J* 2020;39(1):e102190. DOI: 10.15252/embo.2019102190
64. Wang Y., Wu S., Zhu X. et al. LncRNA-encoded polypeptide ASRPS inhibits triple-negative breast cancer angiogenesis. *J Exp Med* 2020;217(3):jem.20190950. DOI: 10.1084/jem.20190950
65. Meng N., Chen M., Chen D. et al. Small protein hidden in lncRNA LOC90024 promotes “cancerous” RNA splicing and tumorigenesis. *Advanced Sci (Weinh)* 2020;7(10):1903233. DOI: 10.1002/advs.201903233

66. Zhu S., Wang J.Z., Chen D. et al. An oncopeptide regulates m(6)A recognition by the m(6)A reader IGF2BP1 and tumorigenesis. *Nat Commun* 2020;11(1):1685. DOI: 10.1038/s41467-020-15403-9
67. Pang Y., Liu Z., Han H. et al. Peptide SMIM30 promotes HCC development by inducing SRC/YES1 membrane anchoring and MAPK pathway activation. *J Hepatol* 2020;73(5):1155–69. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.05.028
68. Xiao X., Wang X., Wang Y. et al. Multi-functional peptide-microRNA nanocomplex for targeted microRNA delivery and function imaging. *Chemistry* 2018;24(9):2277–85. DOI: 10.1002/chem.201705695

ORCID автора / ORCID of author

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

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

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

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-31-46>

Роль трансглутаминазы 2 в регуляции баланса между аутофагией и апоптозом в опухолевых клетках

Ю.А. Гненная¹, О.М. Семёнов¹, Н.А. Барлев^{1,2}

¹ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук»; Россия, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»; Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

Контакты: Юлия Андреевна Гненная gnennaya1996@mail.ru

В нормальной ткани клеточный гомеостаз в значительной степени обусловлен двумя катаболическими путями: апоптозом и аутофагией. Апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель, регулируется проапоптотическими факторами и способствует уничтожению поврежденных клеток. Аутофагия, в свою очередь, включающая в себя 3 формы – макро-, микро- и шаперон-опосредованную аутофагию, – может как способствовать выживанию клеток путем избирательного удаления факторов, потенциально вызывающих апоптоз, так и повышать порог стресса, необходимого для индукции клеточной гибели. В последнее время накапливаются данные, свидетельствующие о существовании общих молекулярных путей между аутофагией и апоптозом, а также о влиянии каспазного матрикса на данные процессы. Одним из важных ферментов, участвующих в координации и регуляции этих процессов, является трансглутаминаза 2 (TG2). Различные типы активностей TG2 вовлечены в поддержание динамического баланса между внутриклеточным матриксом и внутриклеточными процессами аутофагии/апоптоза, в то время как их регуляция может способствовать развитию патогенеза различных заболеваний человека, включая онкогенез. Например, известно, что TG2 может благоприятствовать деградации проапоптотических белков и выживанию клеток почечно-клеточной карциномы в условиях недостатка питательных веществ, модулируя процесс аутофагии. В клетках различных тканей, лишенных TG2, наблюдается скопление агрегатов убиквитинированных белков и поврежденных митохондрий, что вызывает протеотоксический стресс и клеточную смерть. Наоборот, трансамидазная активность TG2 была замечена в ингибировании антиапоптотических сигналов на модели лейкоцитарной моноцитарной лимфомы человека. В данном обзоре описываются важные функции TG2 в онкогенезе, а также подчеркивается двойственность роли этого фермента в модуляции таких противоположных процессов, как выживание клеток и их гибель.

Ключевые слова: трансглутаминаза 2, аутофагия, апоптоз, онкогенез, онкорегуляторы

Для цитирования: Гненная Ю.А., Семёнов О.М., Барлев Н.А. Роль трансглутаминазы 2 в регуляции баланса между аутофагией и апоптозом в опухолевых клетках. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):31–46. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-31-46>

The role of transglutaminase 2 in regulation of the balance between autophagy and apoptosis in tumor cells

Yu.A. Gnennaya¹, O.M. Semenov¹, N.A. Barlev^{1,2}

¹Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences; Russia, 4 Tikhoretsky Prospekt, St. Petersburg 194064, Russia;

²V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry; Bld. 8, 10 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russia

Contacts: Yulia Andreevna Gnennaya gnennaya1996@mail.ru

In normal tissue, cellular homeostasis is largely driven by two catabolic pathways: apoptosis and autophagy. Apoptosis, or programmed cell death, is regulated by pro-apoptotic factors, and promotes the removal of problematic cells. Autophagy, which in turn includes three forms: macro-, micro-, and chaperone-mediated autophagy, can promote both cell survival by selectively removing potentially apoptosis-inducing factors and raising the threshold of stress required for the induction of cell death. Recently, evidence has been accumulating suggesting the existence of common molecular pathways between autophagy and apoptosis, as well as the influence of the extracellular matrix on these processes. One of the important enzymes involved in the coordination and regulation of these processes is transglutaminase 2 (TG2). Different

types of TG2 activities are involved in maintaining the dynamic balance between extracellular matrix and intracellular autophagy/apoptosis processes, while dysregulation of these processes may contribute to the pathogenesis of various human diseases, including oncogenesis. For example, TG2 can promote the degradation of pro-apoptotic proteins and the survival of renal cell carcinoma cells under nutrient-deficient conditions by modulating the autophagy process. In cells of various tissues deprived of TG2, aggregates of ubiquitinated proteins and damaged mitochondria are observed, which in turn induces proteotoxic stress and cell death. Conversely, the transamidase activity of TG2 was observed to inhibit anti-apoptotic signaling in a human leukemic monocytic lymphoma model. In the present review, a number of important functions of TG2 in oncogenesis are described, along with the dual role of TG2 in modulating such opposite processes as cell survival and cell death.

Keywords: transglutaminase 2, autophagy, apoptosis, oncogenesis, oncoregulators

For citation: Gnennaya Yu.A., Semenov O.M., Barlev N.A., The role of transglutaminase 2 in regulation of the balance between autophagy and apoptosis in tumor cells. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):31–46. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-31-46>

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов развития, диагностики и лечения солидных опухолей, выживаемость пациентов с рецидивирующими/прогрессирующими онкологическими заболеваниями остается низкой. Гетерогенность компонентов микроокружения опухоли и возникновение химио- и радиорезистентности являются основными причинами ограниченности противоопухолевых стратегий. Несмотря на появление новейших комбинаций селективных химиотерапевтических препаратов, механизмы резистентности опухоли, обусловленные внутренними генетическими изменениями важнейших молекулярных каскадов или приобретенными эпигенетическими изменениями, уменьшают долгосрочные преимущества методов лечения.

Формирующиеся в солидных опухолях условия гипоксии и недостатка питательных веществ, а также воздействие иммунной системы организма оказывают влияние на раковые клетки, обуславливая динамику прогрессирования патологического процесса.

Активация механизмов выживания опухоли, направленных против проапоптотических сигналов, индуцированных физиологическими и фармакологическими условиями, способствует формированию агрессивного метастатического фенотипа. В настоящее время исследования подобных механизмов непременно включают изучение как микроокружения опухоли, так и реорганизации внеклеточного матрикса (ВКМ). Выделяемые опухолевыми стромальными клетками медиаторы воспаления – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α , TNF- α), трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor β , TGF- β), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), цитокины (интерлейкины-1 β (IL-1 β), -6 (IL-6), -8 (IL-8)) – модулируют злокачественность опухолей через внутриклеточные пути передачи сигналов [1, 2]. Взаимовлияние мутировавших клеток и опухолевой стромы может стать причиной активации эпителиально-ме-

зенхимального перехода, ключевыми параметрами которого являются биофизические характеристики ВКМ [3].

СЕМЕЙСТВО ТРАНСГЛУТАМИНАЗ

Трансглутаминазы (TGs) – это семейство эволюционно консервативных многофункциональных белков, 2 из которых (фибринстабилизирующий фактор XIII (FXIII) и TG1–7) катализируют Ca^{2+} -зависимую посттрансляционную модификацию белков путем образования ковалентных связей между свободными аминогруппами лизина и γ -карбоксамидными группами глутаминов, в то время как белок полосы 4.2 мембраны эритроцитов (EPB42) не имеет каталитической аминокислотной триады для осуществления трансамидазной активности (рис. 1) [4, 5]. Все члены семейства вовлечены в регуляцию физиологических процессов, происходящих в организме человека, а функциональные дефекты активностей TGs могут ассоциироваться с патологиями различной этиологии. К примеру, инактивацию FXIII, являющегося проангиогенным фактором, связывают с развитием хронической венозной недостаточности и неблагоприятным протеканием венозной трофической язвы нижних конечностей, что в том числе обуславливается нарушением инвазии макрофагов и миграции тромбоцитов к ране [6]. Дерегуляция работы TG1 и TG5 приводит к ороговению эпидермиса при коллоидном ихтиозе и синдрому акрального шелушения кожи соответственно [7, 8]. У нокаутных по *TGM3* (transglutaminase 3) мышей нарушается формирование волосяного покрова и наблюдается истощение лорикрина – основного компонента клеточной оболочки эпидермальных клеток [9]. Трансглутаминаза 4 участвует в формировании копулятивной пробки у мышей, в то время как повышенная экспрессия TG4 у человека приводит к развитию агрессивного фенотипа рака простаты [10, 11]. Трансглутаминаза 6 играет большую роль в возникновении ряда нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Хантингтона [12]. Трансглутаминаза 7, предположительно, может быть связана со степенью злокачественности рака молочной железы (РМЖ),

однако данный фермент все еще остается малоизученным в отличие от другого члена семейства – TG2 [13].

УЧАСТИЕ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 2 В МЕЖБЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

Трансглутаминаза 2 (тканевая трансглутаминаза) – фермент, который играет большую роль в прогрессии рака, поскольку способствует реорганизации ВКМ, адгезии опухолевых клеток, а также агрегации опухолевых стволовых клеток в сфериды.

Многообразие функций TG2 определяется ее взаимодействиями с широким спектром внеклеточных, поверхностных и внутриклеточных белков. Трансглутаминаза 2 взаимодействует с фибронектином (FN) благодаря наличию фибронектин-связывающего домена, а нарушение данного взаимодействия может снижать адгезивный потенциал клеток к ВКМ [14]. Этот фермент также секретируется фибробластами, остеобластами и эндотелиальными клетками в ВКМ, где он опосредует взаимодействие с интегринами, SCD4 (синдекан 4, гепаран-сульфат), белками, связанными с рецепторами липопротеинов низкой плотности, и другими компонентами ВКМ [15, 16]. Трансглутаминаза 2 способствует клеточной адгезии и формированию фокальных контактов, соединяя домен II типа FN с субъединицами $\beta 1$ и $\beta 3$ интегринов, что приводит

к активации сигнального пути RhoA/ROCK (Rho-associated protein kinase) посредством подавления активности киназы Src и ингибирования белка 190RhoGAP [17]. Кроме того, сверхэкспрессия TG2 вызывает запуск сигнальной платформы PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/mTOR (mammalian target of rapamycin), что, в свою очередь, способствует ингибированию активности белка FOXO3 (forkhead box O3) – ключевого фактора проапоптотической транскрипции [18]. ГТФазная активность TG2 вовлечена в неканоничную регуляцию опосредованной NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) активации HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), являющегося фактором транскрипции для ряда генов, таких как *Zeb1* (zinc finger E-box binding homeobox 1), *Zeb2*, *Snail* и *Twist*, белки которых участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе. Кроме того, сообщалось, что TGF- $\beta 1$, количество которого значительно больше в микроокружении рака яичников, приводит к накоплению TG2 путем активации NF- κ B, что влечет за собой повышение уровня белка SMAD (suppressor of mothers against decapentaplegic) и индукцию эпителиально-мезенхимального перехода, увеличивая процент CD44⁺/CD117⁺-клеток сфероидного фенотипа в перитонеальном метастазировании [19, 20]. Ca²⁺-связывающий белок CS100A4 стабилизирует открытую

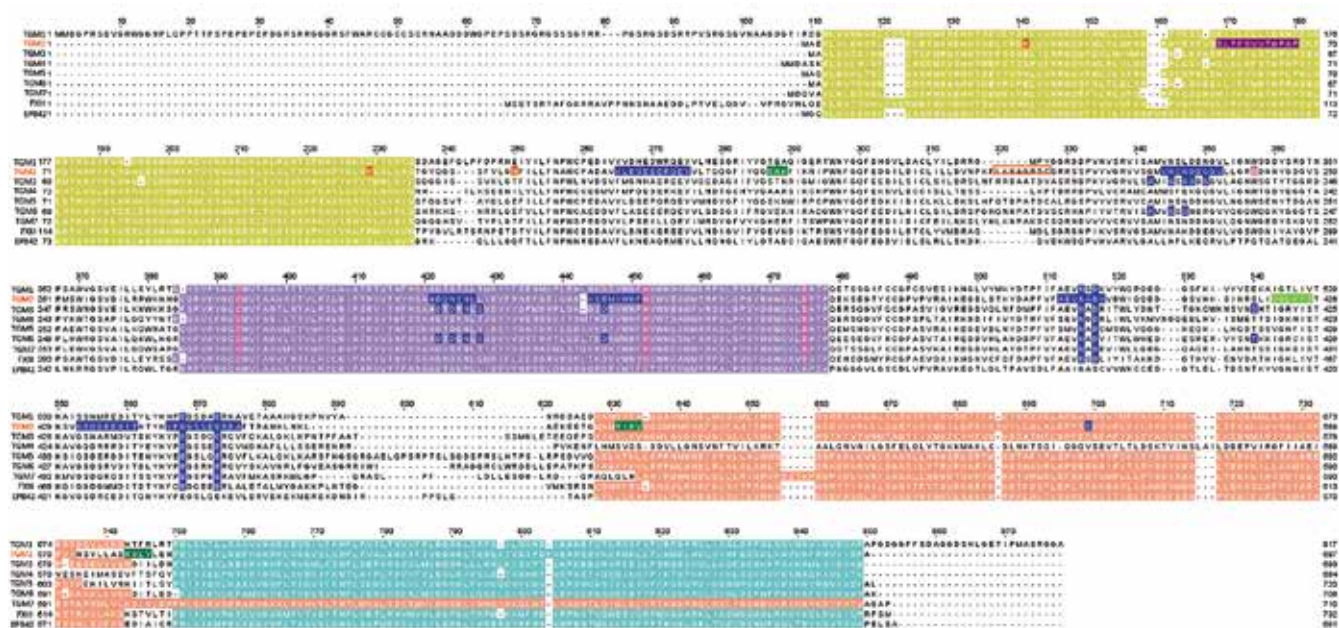


Рис. 1. Аминокислотные последовательности белков семейства трансглутаминаз (выравнивание проводилось с помощью программы ClustalO, домены идентифицированы в базе данных Eukaryotic Linear Motif): N-концевой домен (темно-желтый цвет); каталитический домен (сиреневый цвет); β -баррел 1 домен (светло-розовый цвет), β -баррел 2 домен (голубой цвет), каталитическая триада (темно-розовый цвет; для TG2 также отмечен W241); сайты связывания Ca²⁺ (синий цвет; для TG2 отмечены также участки связывания). Домены, охарактеризованные только для TG2: сайты связывания гуанозинтрифосфата (темно-зеленый цвет); сайты связывания фибронектина (оранжевый цвет); участок связывания регуляторного фактора интерферона (3IRF3) (светло-зеленый цвет); канонический LIR-мотив (LC3-взаимодействующий регион) (фиолетовый цвет); предполагаемый BH3-домен (красная рамка)

Fig. 1. Amino acid sequences of TGs family proteins (alignment was performed using the ClustalO program; domains were identified in the Eukaryotic Linear Motif database): N-terminal domain (dark yellow); catalytic domain (lilac); β -barrel 1 domain (light pink); β -barrel 2 domain (cyan); catalytic triad (dark pink, for TG2 additionally marked W241); Ca²⁺ binding sites (blue, for TG2 additionally marked binding sites). Domains characterized only for TG2: guanine triphosphate binding sites (dark green); fibronectin binding sites (orange); interferon regulatory factor 3 (IRF3) binding site (light green); canonical LIR motif (LC3-interacting region) (purple); putative BH3 domain (red box)

конформацию TG2 в клетках эпителиальной карциномы A431, что способствует клеточной адгезии [21]. Активация пути MEK (mitogen-activated protein kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase)/LHD (lactate dehydrogenase) при сверхэкспрессии TG2 увеличивает скорость протекания гликолиза и способствует пролиферации клеток РМЖ [22].

Трансглутаминаза 2 может выступать в роли маркера опухолеассоциированных фибробластов гепатоцеллюлярной карциномы, являясь конечным звеном IL-6-опосредованной активации оси IL-6/IL6R/STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) [23]. Кроме того, было показано, что TG2 способна регулировать сигнальную ось Wnt (Wingless-related integration site)/ β -catenin как напрямую, так и опосредованно — через взаимодействие с HSF1 (heat shock factor 1) [24]. Дерегуляция канонического каскада Wnt ассоциирована с развитием широкого спектра онкологических заболеваний [25, 26]. Интересно, что не только TG2, но и TG1 — другой член семейства трансглутаминаз — способна регулировать сигнальный путь Wnt, что было продемонстрировано на ряде клеточных линий рака желудка [27]. Необходимо отметить, что именно TG1 и TG2, в отличие от других членов семейства, имеют низкий показатель индекса повреждения генов (GDI) и находятся под сильным селективным отбором [28]. Генетическая абляция того или иного фермента из пары вызывает значительные изменения в уровнях транскриптов фибротических маркеров COL3A1 (collagen type III α -1), α -SMA (α -smooth muscle actin), CTGF (connective tissue growth factor), TGF- β 1 и CCND1 (cyclin D1) в сердечных фибробластах. Одновременно с этим были обнаружены корреляции между уровнями транскриптов *TGM1* или *TGM2* и уровнями нескольких профибротических, пролиферативных и апоптотических маркеров, таких как COL1A1, MMP-2 (matrix metalloproteinase 2), CTGF, CCNE2 и BAX/Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein/B-cell lymphoma 2), что подтверждает возможную роль TG1 и TG2 в опосредовании определенных фибротических сигнальных процессов, клеточной пролиферации и реорганизации ВКМ [29].

Таким образом, члены семейства трансглутаминаз, в частности TG2, играют ключевую роль в регуляции не только внутриклеточных путей, стабилизирующих сигнальные каскады в условиях клеточного стресса, но и структуры и стабильности ВКМ. Уникальность TG2 заключается в ее повсеместном распределении в тканях человека и, как следствие, вовлеченности в регуляцию различных видов рака, что позволяет рассматривать этот фермент как прогностический биомаркер и терапевтическую мишень. Однако роль TG2 в онкогенезе остается противоречивой, поскольку в ряде исследований TG2 характеризуется как потенциальный опухолевый супрессор. В данном обзоре мы затронем роль TG2 в балансе аутофагия/апоптоз в контексте канцерогенеза, что определяет дальнейшие исследования механизмов, посредством которых

этот фермент оказывает влияние на внутри- и внеклеточный протеостаз.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 2

Тканевую трансглутаминазу можно охарактеризовать как довольно универсальный белок, структурно схожий с членами своего семейства, за исключением наличия уникального сайта связывания гуанидиновых нуклеотидов. Помимо наличия у TG2 вышеуказанных трансамидазной и ГТФазной активностей, этот фермент может функционировать как дисульфид-изомераза и серин-треонин-специфическая киназа и обладает неферментативной активностью скаффолд-белков [30–32]. Полноразмерная форма TG2 состоит из 4 доменов: N-концевого (1–139 аминокислотных остатков (а. о.)), каталитического (140–454 а. о.) и 2 последовательно идущих β -баррельных доменов на С-конце (479–687 а. о.) [33]. Кроме того, последовательность TG2 включает в себя 3 сигнала ядерной локализации (NLS) и 1 сигнал ядерного экспорта (NES) [34]. Находящийся на N-конце FN-связывающий сайт соседствует с одним из сайтов связывания гуанозинтрифосфата (ГТФ), в то время как 2 других сайта связывания и гидролиза находятся в коровом и С-концевом доменах [28]. Таким образом, для гидролиза ГТФ необходимы 2 условия: снижение концентрации Ca^{2+} и сближение соответствующих сайтов посредством перехода TG2 в так называемую «закрытую» конформацию. В ГТФ-связанной форме доступ к активному сайту трансамидирования блокирован, а С77 активного сайта присоединен к остатку Y516 с помощью водородной связи [35, 36]. Интересно, что повреждающие несинонимичные однонуклеотидные варианты (nsNSV), нехарактерные для а. о. каталитического домена (C277, H335, D358 и W241), с избытком присутствуют в коротких линейных мотивах (SLiMs), участках взаимодействия с LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) (LIRs) и регионах, необходимых для белок-белковых взаимодействий, что влияет не только на вне- и внутриклеточные функции TG2, но и на локализацию данного белка [28].

Кроме того, согласно данным литературы, существуют неполноразмерные формы TG2 с различными свойствами, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга: TG2-S, TG2-H2, TG2_{v1} и TG2_{v2}. Особенность сплайсированных изоформ заключается в отсутствии различных по длине участков С-конца, что влияет на их способность функционировать как ГТФазы и связывать PLCD1 (phospholipase C delta 1) [37]. Хотя некоторые из этих вариантов TG2 еще не изучены должным образом, изоформа TG2-S, которая, помимо прочего, не имеет NES и одного из NLS (что влияет на ее способность импортироваться в цитозоль), была ассоциирована с дифференцировкой клеток нейроblastомы, болезнью Альцгеймера и лейкомогенезом [38, 39]. Внутриклеточная локализация TG2 также

имеет большое значение в ее функционировании. Основная часть фермента (около 73 %) локализована в цитозоле, где сосредоточены большинство субстратов TG2. Остальное количество TG2 распределено между мембраной (около 20 %) и ядром (около 5–7 %) и варьирует в зависимости от типа клеток и условий эксперимента [40]. Несмотря на то что данных о непосредственном нахождении TG2 в митохондриях нет, известно об участии этого фермента в митофагии и регуляции путей митохондриального дыхания [41]. Далее мы подробнее рассмотрим многофункциональную и противоречивую роль TG2 в регуляции клеточных гомеостаза, смерти и выживания.

Трансглутаминаза 2 в регуляции гомеостаза митохондрий. Впервые роль TG2 в катализе комплексов дыхательной цепи в митохондриях была продемонстрирована при анализе нокаутных по TG2 мышей. Оказалось, что отсутствие дисульфид-изомеразной активности TG2 приводит к дефектам правильной сборки АТФ-синтазы, нарушению секреции инсулина под действием глюкозы и дисфункции митохондриального транспортера АДФ/АТФ ANT1 (adenine nucleotide translocator 1), мутации в котором способствуют пресенильному варианту развития болезни Альцгеймера. Таким образом, данное исследование указывает на участие TG2 в регуляции динамики переноса протонов и, как следствие, ее влияние на развитие митохондриальной патофизиологии [41].

Митофагия является процессом избирательного поглощения и деградации дисфункциональных митохондрий, что необходимо для сохранения и поддержания всего митохондриального ретикула. В мышечных фибробластах (MEF), лишенных TG2, наблюдается накопление фрагментированных митохондрий со сниженным мембранным потенциалом, что, по всей видимости, может быть связано с уменьшением уровня термостабильного белка IF1 (inhibitor of the mitochondrial F1Fo ATPase1). В нормальных условиях IF1 индуцирует цикл деления – слияния митохондрий, способствуя транслокации с динамином белка DRP1 (dynamin-related protein 1) [42]. В отсутствие TG2 количество свободного DRP1 повышается наряду с другим ключевым белком-регулятором гомеостаза митохондрий – PINK1 (phosphatase and tensin (PTEN) homologue-induced kinase 1) [43]. С одной стороны, увеличение PINK1 способствует рекрутированию E3-убиквитинлигазы Parkin и убиквитин-подобного белка LC3 к мембране митохондрий, что благоприятствует митофагии [44]. С другой стороны, TG2-зависимое снижение IF1 приводит к реверсии F1Fo-АТФ-синтазы и нарушению накопления активных форм кислорода (АФК), что может вызывать апоптоз [41]. Наконец, результаты, полученные К. Lénárt и соавт., свидетельствуют о том, что при схожем с MEF фенотипе фрагментированных митохондрий мышечные преадипоциты, нокаутные по TG2, демонстрируют гипометаболизм и значительное снижение продукции

АФК, а это может являться косвенной причиной аутофагии [45]. На клеточных моделях человеческой нейробластомы было показано, что TG2 индуцирует гиперполяризацию митохондриальной мембраны и в то же время способен на взаимодействие с проапоптотическим BAX, но не с антиапоптотическим, Bcl-2. В совокупности это сенсibiliзирует клетки к внутреннему пути запрограммированной клеточной гибели [46, 47]. Напротив, TG2 ингибирует Ca²⁺-индуцированный апоптоз в клетках HEK293 путем ковалентного сшивания BAX [48]. Таким образом, ферментативная активность TG2 может быть вовлечена в регуляцию как клиренса поврежденных белков и целых органелл, так и проапоптотического процесса (табл. 1). Дуальная роль TG2, характерная для малигнизированных клеток, подразумевает рассмотрение взаимодействия этого фермента с главными участниками клеточной судьбы – онкосупрессорами и онкоактиваторами.

Внутриядерная регуляция трансглутаминазы 2. Как уже говорилось ранее, при изучении молекулярных механизмов функционирования TG2 необходимо иметь в виду окружающий клеточный контекст, в том числе взаимообратную регуляцию TG2 белками, многие из которых являются мастер-регуляторами систем передачи сигнала. Известно, что экспрессия *TGM2* может контролироваться рецепторами RARs (retinoic acid receptor) и RXRs (retinoic X receptor) [60]. Помимо ретиноидов, другие факторы, такие как NF-κB-путь, NIF-1, цитокины (IL-1, IL-6, TNF-α, интерферон-γ) и онкогены семейства *myc*, также модулируют экспрессию TG2 [61–65]. Сам фермент способен выступать в роли транскрипционного коактиватора и эпигенетического регулятора гистоновых модификаций [66–68]. Далее мы подробно рассмотрим взаимодействие как цитоплазматического, так и ядерного TG2 с онкорегуляторами, приводящее к регуляции выживания, дифференцировки и апоптоза клеток.

Взаимодействие трансглутаминазы 2 с онкорегуляторами в регуляции баланса аутофагия/апоптоз. Аутофагия представляет собой фундаментальную адаптивную стратегию выживания клеток путем деградации и рециркуляции белковых компонентов и нуклеиновых кислот. В клетках млекопитающих аутофагия реализуется с помощью 3 различных механизмов: микро-, макроаутофагии и шаперон-опосредованной аутофагии [69]. В данном обзоре под термином «аутофагия» подразумевается именно макроаутофагия, поскольку данный механизм в большей степени обеспечивает биоэнергетические потребности клетки, участвует в ответе на внеклеточный стресс (гипоксия, заражение и пр.), а также опосредуется множеством белков, некоторые из которых являются проапоптотическими. Аутофагия – это многоступенчатый процесс, стадии которого обеспечиваются белковыми комплексами, включающими белки ATG (autophagy-related genes). Образование фагофоры начинается с диссоциации mTORC1 и комплекса ULK1 (unc-51-like kinase 1),

Таблица 1. Влияние статуса трансглутаминазы 2 (TG2) на аутофагию/апоптоз в зависимости от типа тканевой локализации

Table 1. Effect of transglutaminase 2 (TG2) status on autophagy/apoptosis depending on the type of tissue localization

| Экспериментальная модель/нокаутные по TG2 мыши (кардиомиоциты, гепатоциты) Experimental model/TG2 knockout mice (cardiomyocytes, hepatocytes) | Уровень TG2 в клетках The level of TG2 in cells | Механизм TG2-опосредованного влияния на аутофагию/апоптоз Mechanism of TG2-mediated effects on autophagy/apoptosis | Источник References |
|--|--|---|--|
| Нокаутные по TG2 мыши (кардиомиоциты, гепатоциты) TG2 knockout mice (cardiomyocytes, hepatocytes) | Отсутствует Absent | Подавление слияния аутофагосом с лизосомами, усиление активности каспазы-3 Suppression of autophagosomes fusion with lysosomes, enhancement of caspase-3 activity | M. D'Eletto и соавт., 2009, 2012 [49, 50], F. Rossin и соавт., 2012 [51] M. D'Eletto et al., 2009, 2012 [49, 50], F. Rossin et al., 2012 [51] |
| Почечно-клеточный рак Renal cell cancer | Высокий High | Подавление апоптоза вследствие TG2-опосредованной деградации p53 в аутофагосомах Suppression of apoptosis due to TG2-mediated degradation of p53 in autophagosomes | J. Kang и соавт., 2016 [52] J. Kang et al., 2016 [52] |
| Рак толстой кишки Colorectal cancer | Высокий High | Подавление апоптоза вследствие TG2-опосредованной деградации p53 в аутофагосомах Suppression of apoptosis due to TG2-mediated degradation of p53 in autophagosomes | P. Malkomes и соавт., 2021 [53] P. Malkomes et al., 2021 [53] |
| Фибробласты Fibroblasts | Низкий Low | Подавление слияния аутофагосом с лизосомами вследствие дальнейшего снижения уровня TG2 Suppression of autophagosome fusion with lysosomes due to further decrease in TG2 levels | S.D. Lamore и G.T. Wondrack, 2012 [54] S.D. Lamore and G.T. Wondrack, 2012 [54] |
| Лейкемическая моноцитарная лимфома Leukemic monocytic lymphoma | Низкий Low | Подавление апоптоза вследствие полимеризации pRb Suppression of apoptosis due to pRb polymerization | S. Oliverio и соавт., 1997 [55] S. Oliverio et al., 1997 [55] |
| Рак молочной железы Breast cancer | Низкий Low | Подавление апоптоза вследствие фосфорилирования pRb Suppression of apoptosis due to phosphorylation of Rb | S. Mishra и соавт., 2007 [56] S. Mishra et al., 2007 [56] |
| Рак молочной железы/мышинные фибробласты Breast cancer/mouse fibroblasts | Высокий High | Подавление апоптоза вследствие ингибирования активности PTEN Suppression of apoptosis due to inhibition of PTEN activity | Y. Wang и соавт., 2012 [57] Y. Wang et al., 2012 [57] |
| Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer | Высокий High | Индукция аутофагии вследствие снижения уровня TG2 Induction of autophagy due to decreased TG2 levels | U. Akar и соавт., 2007 [58] U. Akar et al., 2007 [58] |
| Рак молочной железы Breast cancer | Низкий Low | Подавление апоптоза вследствие TG2-опосредованной дестабилизации нуклеофозмина – шаперона BAX Suppression of apoptosis due to TG2-mediated destabilization of the nucleophosmin – chaperone of BAX | R.-S. Park и соавт., 2009 [59] R.-S. Park et al., 2009 [59] |
| Нейробластома Neuroblastoma | Низкий Low | Индукция апоптоза вследствие TG2-опосредованного высвобождения цитохрома C Induction of apoptosis due to TG2-mediated release of cytochrome C | C. Rodolfo и соавт., 2004 [47] C. Rodolfo et al., 2004 [47] |

включающего ATG13, ULK1, ULK2, RB1CC1 (RB1-inducible coiled-coil 1) и ATG101. ULK1 фосфорилирует AMBRA1 (activating molecule in beclin-1-regulated autophagy), способствуя реорганизации микротрубочек и высвобождению комплекса PI3KC3-C1 (VPS15 (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit), VPS34/PIK3C3, ATG14, BECN1 (beclin-1), UVRAG (UV radiation

resistance-associated gene protein)), который, в свою очередь, взаимодействует с DFPC1 (double FYVE domain-containing protein 1), ATG2 и WIPI1 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1) и рекрутирует другие белки ATG. Белки ATG7 и ATG10 опосредуют образование комплекса ATG5-ATG12, который связывается с ATG16L1 для элонгации мембраны

и трансформации фагофора в двумембранную аутофагосому. Тем временем цитозольный LC3 под действием ATG4 расщепляется до LC3-IB, который при участии белков ATG7, ATG10 и комплекса ATG16L1 конъюгируется с фосфатидилэтаноламином, образуя LC3-II. Дальнейшее преобразование аутофагосомы и слияние с лизосомой опосредуются паралогами ATG8 и ATG18, комплексом ATG2A-ATG18, трансмембранным белком ATG9 и SNX18 (Sorting Nexin 18) [70–72].

В клетках нормальных тканей аутофагия обеспечивает надежный клиренс поврежденных органелл или белковых комплексов, в то время как конститутивный стресс может способствовать аутофагической гибели клеток [73]. Однако некоторые малигнизированные клетки способны долгое время выживать в условиях гипоксии и недостатка внешних питательных веществ, что говорит об адаптации механизмов аутофагии при нарушенной регуляции данного процесса со стороны онкосупрессоров [74].

Апоптоз является наиболее изученным механизмом запрограммированной клеточной гибели в ответ на различные внутриклеточные (повышение концентрации Ca^{2+} , накопление АФК, гипоксия, митогенная стимуляция) и внешние (бактериальные токсины, дерегуляция факторами роста и гормонами, генотоксические агенты) сигналы. В зависимости от сигнала, вызывающего апоптоз, были выделены 2 различных механизма апоптоза. Внутренний путь, характеризующийся пермеабиллизацией наружной мембраны митохондрий, начинается с активации белков с доменом Bcl-2 гомологии 3 (BH3) (BIM (BCL-2 interacting mediator of cell death), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), BID (BH3 interacting domain death agonist), BMF (Bcl-2-modifying factor), BAD (Bcl-2-associated agonist of cell death), BIK (Bcl-2-interacting killer), NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), HRK (activator of apoptosis harakiri)), которые связываются с антиапоптотическими белками Bcl-2, не позволяя им ингибировать проапоптотические белки BAX/BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer). Активированные BAX/BAK образуют поры в мембране митохондрий, что приводит к высвобождению эффекторов апоптоза, включая второй митохондриальный активатор каспаз SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase), сериновую протеазу OMI (protein HtrA2) и цитохром С. Цитохром С связывается с APAF1 (apoptotic protease activating factor 1) и каспазой-9 в цитозоле с образованием апоптосомы, которая затем активирует эффекторные каспазы 3 и 7, что приводит к гибели клетки. Внешний путь начинается со стимуляции специфических рецепторов смерти при связывании их лигандов, таких как TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) и TNF. Связывание лигандов вызывает тримеризацию рецепторов и привлечение FADD (Fas-associated death domain protein), прокаспазы-8 и прокаспазы-10 для формирования сигнального комплекса DISC (Fas-based death-inducing signaling

complex) с последующей активацией каспаз, что способствует гибели клеток путем активации эффекторных каспаз [75, 76].

Внешний и внутренний пути апоптоза заканчиваются активацией каспазы-3 с последующим высвобождением эндонуклеазы CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2) от специфического ингибитора ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase), что приводит к деградации хромосомной ДНК. Также каспаза-3 вызывает реорганизацию цитоскелета путем расщепления гельсолина, образование апоптотических телец и протеолиз белка PARP1 (Poly-ADP-ribose polymerase 1), опосредующего репарацию ДНК [77, 78]. Опухолевые клетки могут приобретать устойчивость к апоптозу путем конститутивной экспрессии антиапоптотических белков, с одной стороны, и подавлением проапоптотических белков, с другой. К примеру, присутствие мутантного онкосупрессора p53, являющегося транскрипционным фактором для белков NOXA, PUMA, BAX, BID и APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1) и также участвующего в активации каспазы-3 и каспазы-8, дестабилизирует механизм внутреннего пути апоптоза [79].

Как аутофагия, так и апоптоз являются многофакторными процессами, задействующими большую часть ресурсов и машинерии клетки. Поэтому неудивительно, что некоторые канонические белки проявляют многозадачность и опосредуют тот или иной процесс в соответствии с окружающими условиями. Узлы перекрестного взаимодействия включают взаимодействия BECN1 с Bcl-2, UVRAG с BAX и ATG5 с FADD. Кальпаины, или Ca^{2+} -зависимые цистеиновые протеазы, участвующие в аутофагии, способны расщеплять Bcl-2, PARP1 и ATG5, способствуя апоптозу. Локализующиеся в просвете аутофагосом члены семейства DAPK (death-associated protein kinase 1) могут диссоциировать BECN1 от Bcl-2 и выступать в роли медиаторов эффекторных каспаз [80]. Несмотря на то что p53 регулирует экспрессию проапоптотических белков, он также способствует активации модулятора аутофагии DRAM (damage-regulated autophagy modulator) и киназ Cdc42/JNK1 (cell division control protein 42 homolog/c-Jun N-Terminal protein kinase 1), которые, в свою очередь, фосфорилируют Bcl-2, нарушая его взаимодействие с BECN1 [72]. Трансглутаминаза 2 также может влиять на взаимодействие BECN1 с белками семейства Bcl-2, предположительно связываясь с последними через последовательность, на 80 % гомологичную последовательности BH3-домена (рис. 1). При этом TG2 участвует в сшивании комплекса BECN1/AMBRA1 [51, 81]. Кроме того, известно, что данный фермент, имеющий предполагаемый LIR-мотив, который обеспечивает распознавание LC3/ATG8, проявляет шаперонную активность, транспортируя грузы на мембрану фагофора [28]. Наконец, TG2 способна влиять как на p53, так и на другие онкосупрессоры, участвующие в регуляции процессов аутофагии и апоптоза.

Трансглутаминаза 2 способна модулировать функции белка ретинобластомы (pRb), который является ключевым регулятором клеточного цикла. Ядерная TG2 полимеризует pRb в клетках лейкоемической моноцитарной лимфомы человека, подвергающихся апоптозу, что приводит к потере антиапоптотического действия pRb, деградации фактора транскрипции E2F1 и ускорению апоптоза [55]. Однако в ряду других клеточных линий обработка ретиноевой кислотой продлевает TG2-опосредованное антиапоптотическое действие pRb, защищая его от деградации каспазой-7 [82]. Также было установлено, что pRb является субстратом для киназной активности TG2, а фосфорилирование pRb по Ser780 дестабилизирует комплекс pRb-E2F1 и усиливает апоптоз в клетках карциномы молочной железы MCF-7 [56]. Согласно результатам данных исследований, внутриядерная концентрация Ca²⁺ является определяющим фактором, опосредующим противоположные функции TG2 на pRb.

Транскрипционный фактор Sp1, регулирующий ряд генов, влияющих на выживание и пролиферацию

клеток, является еще одним транскрипционным фактором-субстратом для TG2 [83]. Гиперактивация TG2 в результате клеточного повреждения или стресса может приводить к чрезмерной олигомеризации Sp1, что способствует гибели клеток при алкогольном и неалкогольном стеатогепатитах. Так, обработка ациклическим ретиноидом приводит к активации каспазы-3, сшивающей способности TG2 и олигомеризации Sp1 в клетках гепатоклеточной карциномы [84]. При этом в клетках линии колоректального рака HCT116 TG2 подавляет тапсигаргин-опосредованный апоптоз путем сшивания и инактивации каспазы-3 [85].

Многofункциональный транскрипционный фактор p53 называют стражем генома ввиду его активации при накоплении повреждений ДНК и регуляции множества проапоптотических белков. В большинстве опухолей человека p53 либо мутирован, либо репрессирован сверхэкспрессией E3-убиквитинлигазы MDM2 (mouse double minute 2) [86]. Однако, по последним данным, есть основания полагать, что повышенная экспрессия TG2 в различных опухолях коррелирует

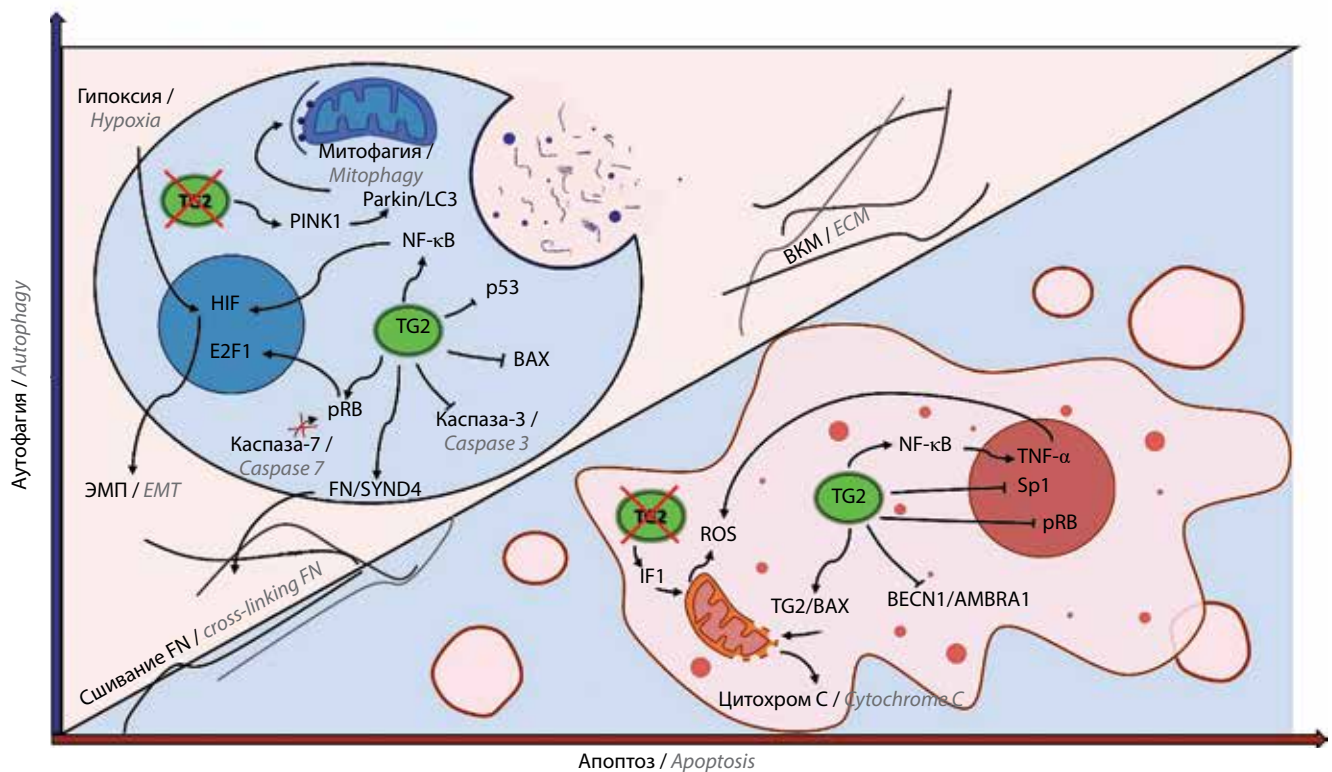


Рис. 2. Влияние трансглутаминазы 2 (TG2) на процессы аутофагии/апоптоза. Присутствие или отсутствие отдельных белков и сигнальных каскадов зависит от типа тканевой локализации. LC3 – убиквитин-подобный белок 1A/1B-легкая цепь 3; PINK1 – PTEN-индуцированная киназа 1; NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB; HIF – фактор, индуцированный гипоксией; BAX – Bcl-2-ассоциированный X-белок; E2F1 – транскрипционный фактор 1 E2F; pRb – белок ретинобластомы; FN – фибронектин; SYND4 – синдекан 4; ROS – активные формы кислорода; BECN1 – беклин-1; AMBRA1 – активируемая молекула в beclin-1-регулируемой аутофагии; Sp1 – белок специфичности 1; IF1 – ингибитор митохондриальной F1Fo-АТФазы; TNF-α – фактор некроза опухоли α; BKM – внеклеточный матрикс; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

Fig. 2. Effect of transglutaminase 2 (TG2) on autophagy/apoptosis processes (schematic). The presence or absence of individual proteins and signaling cascades depends on the type of tissue localization. LC3 – microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; PINK1 – PTEN induced kinase 1; NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; HIF – hypoxia-inducible factor; BAX – Bcl-2-associated X protein; E2F1 – E2F transcription factor 1; pRb – retinoblastoma-protein; FN – fibronectin; SYND4 – syndecan 4; ROS – reactive oxygen species; BECN1 – beclin-1; AMBRA1 – activating molecule in beclin-1-regulated autophagy protein 1; Sp1 – specificity protein 1; IF1 – inhibitor of the mitochondrial F1Fo ATPase 1; TNF-α – tumor necrosis factor α; ECM – extracellular matrix; EMT – epithelial-mesenchymal transition

с нестабильностью p53. Трансглутаминаза 2 способствует протеасомной деградации p53, сшивая его с убиквитин-связывающим белком p62 и транслоцируя белки в аутофагосомы [52, 53, 87]. TG2-опосредованное истощение p53 способствует увеличению доступности кофактора p300, необходимого для активации NIF1A – субъединицы белка NIF-1, что приводит к индукции ангиогенеза в почечно-клеточном раке [88].

Еще одним важнейшим транскрипционным фактором, взаимодействующим с TG2, является NF-κB. Он не только участвует в формировании иммунного ответа, но также может способствовать прогрессированию различного типа опухолей [89]. Было показано, что TG2 полимеризует субъединицу комплекса NF-κB IκBα, создавая условия для диссоциации комплекса и транслокации NF-κB в ядро, что, в свою очередь, способствует TNF-α-опосредованному накоплению оксида азота и АФК [90, 91]. Кроме того, фосфорилирование TG2 по Ser 216 облегчает TG2-опосредованную активацию NF-κB и стимулирует подавление PTEN [57]. Трансглутаминаза 2 способствует деградации PTEN посредством убиквитинирования, активации сигнального пути FAK/АКТ (focal adhesion kinase/protein kinase B) и, как следствие, выживанию опухолевых клеток поджелудочной железы [92].

Таким образом, TG2 выступает в роли еще одного перспективного регулятора перекрестного взаимодействия между аутофагией и апоптозом (см. рис. 2). В ряде работ показано участие TG2 в созревании аутофагосом, в то время как малейшее колебание внутриклеточных параметров может привести к функциональным изменениям активности TG2 и, как следствие, к нарушению баланса в сторону клеточной гибели [49, 50, 93]. Наконец, недавние исследования демонстрируют участие TG2 в еще одном типе клеточной гибели – ферроптозе, характеризующемся токсичным железозависимым накоплением перекисей липидов, что еще больше подчеркивает значимость изучения и понимания всех молекулярных процессов, в которые вовлечена TG2 [94].

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 2 В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ РАКА

В ряде исследований продемонстрирована роль TG2 в качестве прогностического маркера в различных типах онкологических заболеваний (табл. 2). Так, иммуногистохимическое (ИГХ) исследование образцов биопсии карциномы почки показало, что в большинстве первичных опухолей уровень TG2 был ниже в 2,9 раза по сравнению с образцами нормального эпителия почки, независимо от гистопатологических параметров и метастазирования. При этом образцы с повышенным уровнем TG2 (в 1,9 раза относительно окружающей нормальной ткани) в 82 % случаев характеризовались увеличением сигнала от ITGB1 (integrin subunit beta 1) и SDC4. У пациентов с такими данными наблю-

дались метастазы и пониженный уровень некроза опухолевой ткани. При этом ферментативная активность TG2 в опухолевых клетках была снижена по сравнению с нормальной тканью. Авторы делают вывод, что TG2 связывает белки ВКМ и моделирует адгезионные взаимодействия клеток, способствуя их выживанию и распространению [95]. Другое ИГХ-исследование парафиновых срезов биоптатов карциномы почки, полученных от пациентов с метастазами (1-я группа) и без них (2-я группа), показало, что уровень сигнала TG2 в первичной опухоли в группе пациентов с наличием метастазов был выше, чем в группе без них. В 1-й группе разница в уровне TG2 между первичной опухолью и метастазами почти не отмечалась [96]. Кроме того, одно исследование парафиновых срезов 683 пациентов с карциномой почки, которым была выполнена полная/частичная нефрэктомия, продемонстрировало взаимосвязь высокого уровня сигнала TG2 с неблагоприятным клиническим прогнозом [97].

Исследование 100 образцов рака желчного пузыря и 28 образцов нормальной ткани выявило связь TG2 с развитием патологии. Положительный сигнал от TG2 наблюдался в 62 % опухолевых проб и в 21 % проб нормальной ткани. Более того, из 16 проб, полученных от пациентов с рецидивом, 15 были TG2-положительными. У больных, получавших паллиативную помощь, интенсивный сигнал TG2 в образцах опухоли коррелировал с низкими показателями выживаемости по сравнению с больными, биоптаты которых характеризовались пониженным уровнем TG2 [98].

Данные ИГХ-мечения TG2, полученные на образцах опухолей желудка, показали наличие интенсивного сигнала TG2 у пациентов на поздних стадиях с активной инвазией в окружающую ткань. В ходе экспериментов на клеточных линиях рака желудка с нокдауном гена *TGM2* выявлено влияние экспрессии *TGM2* на активацию сигнального пути ERK1/2, что способствовало выживанию, пролиферации и инвазии опухолевых клеток [99]. В другом исследовании биоптатов пациентов с раком желудка показана корреляция сигнала TG2 и маркера опухолевых макрофагов CD163. Повышенный сигнал TG2 в опухоли также был ассоциирован с неблагоприятным прогнозом. Авторы выявили положительное влияние сверхэкспрессии TG2 на повышенную выработку хемокинов CCL2 (chemokine (C–C motif) ligand 2) и CXCL10 (C–X–C motif chemokine 10), привлекающих макрофаги в ответ наработку IL-1β. При этом TG2 не влияла на уровень фосфорилирования NF-κB, отмечающегося при активации данного сигнального пути в ответ на воздействие IL-1β [100].

При исследовании материалов пациентов с карциномой пищевода показано, что сверхэкспрессия *TGM2* в 128 клинических образцах (по данным количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени) была ассоциирована с поздними стадиями, низкой дифференцировкой клеток и опухолевым

Таблица 2. Клинические данные об участии трансглутаминазы 2 (TG2) в онкогенезе

Table 2. Clinical data on the involvement of transglutaminase 2 (TG2) in oncogenesis

| Локализация опухоли Tumor location | Метод исследования Research method | Прогностическое значение TG2 Prognostic value of TG2 | Механизм действия TG2 Mechanism of action of TG2 | Источник Reference |
|--|---|---|--|--|
| Почечно-клеточный рак Renal cell cancer | ИГХ ИНС | Высокий уровень TG2 в опухоли относительно окружающей ткани коррелирует с наличием метастазов High levels of TG2 in the tumor relative to surrounding tissue correlate with the presence of metastasis | TG2 взаимодействует с внеклеточным матриксом и регулирует межклеточную адгезию TG2 interacts with the extracellular matrix and regulates intercellular adhesion | E. M. Erdem и соавт., 2014 [95] E. M. Erdem et al., 2014 [95] |
| | | Высокий уровень TG2 соответствует поздним стадиям заболевания и коррелирует с низкими показателями опухолеспецифической выживаемости High TG2 level corresponds to late stages of the disease and correlates with low cancer-specific survival | — | E. S. Erdem и соавт., 2015 [96] E. S. Erdem et al., 2015 [96] |
| | | Высокий уровень TG2 соответствует поздним стадиям заболевания и коррелирует с низкими показателями опухолеспецифической выживаемости High TG2 level corresponds to late stages of the disease and correlates with low cancer-specific survival | — | M. J. Park и соавт., 2015 [97] M. J. Park et al., 2015 [97] |
| Карцинома желчного пузыря Gallbladder carcinoma | ИГХ ИНС | Высокий уровень TG2 в опухоли относительно окружающей ткани коррелирует с вероятностью развития рецидива, связан с низкими показателями выживаемости в группе паллиативных пациентов High TG2 level in the tumor relative to the surrounding tissue correlates with the probability of recurrence and is associated with low survival in palliative patients | — | S. Gupta и соавт., 2020 [98] S. Gupta et al., 2020 [98] |
| Карцинома желудка Gastric carcinoma | ОТ-ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, ИГХ, клеточная модель, мышиная модель RT-PCR, western blot analysis, ИНС, cell model, mouse model | Высокий уровень TG2 соответствует поздним стадиям заболевания и коррелирует с интенсивной инвазией опухоли High TG2 level corresponds to late stages of the disease and correlates with active tumor invasion | Положительное влияние TG2 на активацию ERK1/2-сигнального пути Positive effect of TG2 on the activation of ERK1/2 signaling pathway | X. Wang и соавт., 2016 [99] X. Wang et al., 2016 [99] |
| | ОТ-ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, ИГХ, клеточная модель RT-PCR, western blot analysis, ИНС, cell model | Высокий уровень TG2 коррелирует с низкими показателями общей выживаемости и наличием маркера опухолевых макрофагов CD163 High TG2 level correlates with low overall survival and the presence of CD163 marker of tumor-associated macrophages | Положительное влияние TG2 на выработку хемокинов CCL2 и CXCL10 при воздействии IL-1 β Positive effect of TG2 on CCL2 and CXCL10 chemokine production upon IL-1 β exposure | S.-X. Cho и соавт., 2020 [100] S.-X. Cho et al., 2020 [100] |
| Карцинома пищевода Esophageal carcinoma | ОТ-ПЦР в реальном времени, ИГХ, клеточная модель RT-PCR, ИНС, cell model | Повышенная экспрессия <i>TGM2</i> характерна для поздних стадий, низкой степени дифференцировки клеток и опухолеассоциированного воспаления Increased <i>TGM2</i> expression is associated with advanced stages, low cell differentiation and tumor-associated inflammation | Положительное влияние TG2 на устойчивость клеток к цисплатину Positive effect of TG2 on cell resistance to cisplatin | D. T. Leicht и соавт., 2014 [101] D. T. Leicht et al., 2014 [101] |
| | ИГХ, вестерн-блоттинг, клеточная модель ИНС, western blot analysis, cell model | Высокий уровень TG2 коррелирует с инвазией опухоли и метастазированием в лимфатические узлы High TG2 level correlates with tumor invasion and metastasis to lymph nodes | — | T. Kausar и соавт., 2011 [102] T. Kausar et al., 2011 [102] |

| Локализация опухоли Tumor location | Метод исследования Research method | Прогностическое значение TG2 Prognostic value of TG2 | Механизм действия TG2 Mechanism of action of TG2 | Источник Reference |
|---|--|---|---|--|
| Карцинома гортани Laryngeal carcinoma | ИГХ IHC | Низкий уровень TG2 совместно с высоким уровнем белка BNIP3 соответствует высоким показателям общей выживаемости Low TG2 level with high BNIP3 protein level is associated with high overall survival | — | T. Jin и соавт., 2012 [103] T. Jin et al., 2012 [103] |
| Аденокарцинома поджелудочной железы Pancreatic carcinoma | ОТ-ПЦР в реальном времени, ИГХ, вестерн-блоттинг, клеточная модель, мышинная модель RT-PCR, IHC, western blot analysis, cell model, mouse model | Уровень TG2 негативно коррелирует с уровнем PTEN, что соответствует низким показателям общей выживаемости для пациентов с заболеванием II стадии TG2 level negatively correlates with PTEN level which is associated with low overall survival of patients with stage II disease | TG2 снижает активность фосфатазы PTEN, способствуя активации Akt-сигнального пути TG2 decreases PTEN phosphatase activity, promoting activation of the Akt-signaling pathway | A. Verma и соавт., 2008 [92] A. Verma et al., 2008 [92] |
| Колоректальная карцинома Colorectal carcinoma | ОТ-ПЦР в реальном времени, клеточная модель RT-PCR, cell model | Высокая экспрессия <i>TGM2</i> соответствует низким показателям общей выживаемости High <i>TGM2</i> expression is associated with low overall survival | Положительное влияние TG2 на пролиферацию клеток Positive effects of TG2 on cell proliferation | N. Miyoshi и соавт., 2010 [104] N. Miyoshi et al., 2010 [104] |
| | ОТ-ПЦР в реальном времени, ИГХ RT-PCR, IHC | | — | M.J. Fernández-Aceñero и соавт., 2016 [105] M.J. Fernández-Aceñero et al., 2016 [105] |

воспалением. Данные были подтверждены на уровне белка с помощью ИГХ-исследования. Резистентные к химиотерапии опухоли характеризовались сверхэкспрессией *TGM2*. Клеточная модель показала, что нокдаун TG2 на линии OE33 приводит к снижению резистентности клеток к цисплатину [101]. В других исследованиях получены данные о повышенных сигналах от рецептора 56, связанного с G-белком (GPR56), TG2 и NF- κ B в опухолевой ткани, по сравнению с нормальной тканью. Выявление этих 3 белков коррелировало с инвазией и метастазированием в лимфатические узлы. В ткани злокачественной опухоли TG2 определялась как в строме, так и в цитоплазме клеток [102].

В 148 клинических образцах ларингеальной плоскоклеточной карциномы была выявлена положительная взаимосвязь высокой экспрессии проапоптотического гена *BNIP3* (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3) и низкой экспрессии *TGM2* с общей выживаемостью. Оба гена регулируются транскрипционным фактором HIF1 и характерны для гипоксических клеток, устойчивых к терапии [103].

На клетках рака поджелудочной железы было продемонстрировано влияние сверхэкспрессии *TGM2* на стабильность фосфатазы PTEN, выступающей в качестве онкосупрессора. Сверхэкспрессия *TGM2* способствовала снижению уровня PTEN и повышала активацию

ФАК/АКТ-сигнального пути, благоприятствующего выживанию и пролиферации опухолевых клеток. На мышинной модели клетки с нокдауном гена *TGM2* формировали опухоли меньшего объема. Иммуногистохимическое мечение биоптатов пациентов с раком поджелудочной железы II стадии показало негативную корреляцию сигнала от TG2 и PTEN. Также авторы выявили, что TG2-опосредованная потеря PTEN выступает как независимый прогностический признак в данной группе пациентов [92].

Исследование с помощью ПЦР в реальном времени образцов колоректальных карцином и нормальной ткани выявило связь высокой экспрессии *TGM2* в образцах опухолей с низкими показателями общей выживаемости. Авторы показали на клеточной модели, что нокдаун *TGM2* уменьшал пролиферацию клеток [104]. В другом исследовании обнаружена ассоциация повышенной экспрессии *TGM2* на уровне матричной РНК (мРНК) с ранним рецидивом. При ИГХ-мечении образцов биоптатов было показано, что сигнал от TG2 в эпителиальных клетках значимо и независимо связан с метастазированием и со снижением показателей общей выживаемости. У пациентов без метастатического поражения уровень стромальной TG2 был значимо ассоциирован с низкими показателями выживаемости без рецидивов [105].

Прогностическое значение TG2 показано и для эндометриального рака. Так, было изучено содержание ряда белков в плазме крови с помощью мультиплексного иммуноферментного анализа материалов, полученных от 45 пациенток с опухолью эндометрия, 11 пациенток с эндометриозом, и в 20 контрольных образцах. Выявлено, что одновременное повышение уровней TG2, маркера стволовых клеток CD44 и молекул адгезии EpCAM являлось надежным признаком поздних стадий эндометриального рака [106]. В другом исследовании образцов плазмы крови здоровых доноров, больных эндометриальным раком и доброкачественной миомой с помощью иммуноферментного анализа было также показано, что высокое содержание TG2 и EpCAM и ряда других белков свидетельствует о раке эндометрия. При этом уровень TG2 в группе пациенток после операции был ниже по сравнению с группой больных, не подвергавшихся хирургическому вмешательству [107]. Тем не менее статистическое исследование данных базы «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) не выявило прогностического значения этого фермента в группе эндометриального рака, характеризующейся наличием мутантного белка FBXW7 (F-box/WD repeat-containing protein 7), так же как и связи экспрессии TG2 с мутацией в FBXW7 [108].

Анализ 24 первичных культур клеток, выделенных из образцов менингиомы арахноидеи, показал повышенный уровень TG2 в опухолевых клетках. Иммуногистохимическое исследование 82 образцов опухолей также выявило высокий уровень этого фермента. Ингибирование экспрессии TGM2 с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) и блокировка цистамином способствовали гибели клеток через снижение АКТ и активацию каспазы-3 [109]. Еще одно исследование 50 образцов менингиомы показало, что сигнал от TXNIP (thioredoxin-interacting-protein) в 28 (56 %) из 50 проб положительно коррелировал с ранними стадиями и низкой окраской на маркер пролиферации Ki-67, в то время как сигнал от TG2 в 21 (42 %) из 50 случаев, наоборот, был ассоциирован с поздними стадиями и высоким уровнем Ki-67 [110].

Исследование выделенных клеток пациентов с радиорезистентной глиобластомой с помощью тандемной масс-спектрометрии показало повышенное содержание в них SDC1 и TG2, что способствовало неблагоприятному прогнозу. Такие клетки характеризовались активной аутофагией. В ходе исследования эффектов от нокдауна TGM2 авторы выявили механизм, при котором SDC1 запускает транспортировку TG2 в лизосомы с поверхности клетки при воздействии радиации. При этом TG2, взаимодействуя с LC3, способствовала созреванию аутофагосом [111].

Для меланомы, характеризующейся наибольшим числом мутаций в TGM2 среди всех онкологических заболеваний человека, было показано, что TG2 — единственный белок семейства, экспрессия которого

ассоциирована с лучшими показателями общей выживаемости. Исследования выявили положительную взаимосвязь сверхэкспрессии TGM2 на уровне мРНК и противоопухолевым иммунитетом [112].

Анализ данных 511 пациентов с острым миелоидным лейкозом с помощью протеомного анализа показал повышение уровня TG2 при рецидивах. Уровень этого фермента коррелировал с экспрессией молекул адгезии и рядом апоптотических белков [113]. В другом исследовании на образцах пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом продемонстрирована положительная корреляция между экспрессией TG2 и синдромом дифференцировки, возникающим при терапии триоксидом свинца и транс-ретиноевой кислотой [114].

Согласно результатам при ИГХ-исследовании образцов 120 пациентов с раком легких, у 102 из которых была аденокарцинома, выживаемость без рецидивов в этой группе не коррелировала с уровнем TG2 в опухолях. Однако среди больных, проходивших терапию ингибиторами тирозинкиназ, выживаемость без прогрессирования была выше при низком уровне TG2 [115]. Исследование образцов 194 пациентов с немелкоклеточным раком легкого показало, что экспрессия TGM2 (на уровне мРНК и белка) была выше в раковой ткани по сравнению с окружающей нормальной тканью. Низкая экспрессия гена TGM2 в раковой ткани коррелирована с более высокими показателями общей выживаемости и выживаемости без рецидивов [116].

Прогностическая роль TG2 показана и при РМЖ. Так, в ретроспективном ИГХ-исследовании 253 образцов ткани РМЖ и 40 образцов нормальной ткани выявлен более высокий по сравнению с нормальной тканью уровень стромальной TG2 в 114 (45,0 %) из 253 опухолевых проб. В инвазивных протоковых карциномах уровень TG2 был повышен в 97 (57,7 %) из 168 случаев. В этой группе высокое содержание TG2 в строме соответствовало низким показателям выживаемости. В данных пробах в строме выявлялся N-ε-(γ-L-глутамил) — лизин, наличие которого говорит о ферментативной активности TG2 [117]. К тому же исследование выявило связь между высоким уровнем TG2 в ткани и меньшим количеством метастазов в лимфатических узлах. Снижение инвазивности клеток MDA-MB-231 было продемонстрировано в ходе заселения клетками матрицеля с добавлением TG2 [118]. Клетки РМЖ с нокдауном TGM2 уменьшали выработку IL-6. На мышинной модели продемонстрировано снижение их способности формировать опухоли и метастазировать в легкие. Исследование 412 проб пациентов показало, что на поздних стадиях экспрессия TGM2 в первичной опухоли коррелирует с низкими показателями выживаемости без рецидивов и метастазов. Анализ доступных баз данных продемонстрировал, что для совместной экспрессии TGM2 и IL-6 характерны худшие показатели выживаемости без метастазирования по сравнению со случаями, где была повышена только экспрессия

IL-6 [119]. В исследовании D. Ху и соавт. также показано, что повышенный уровень TG2 является неблагоприятным прогностическим признаком. На клеточной модели РМЖ авторы выявили влияние этого фермента на активацию гликолиза в клетках через MEK-ERK-LDH-сигнальный путь, обеспечивающий метаболизм и выживание клеток [22].

Наконец, метаанализ (февраль 2023 г.), в который включены данные 11 исследований различных типов солидных опухолей (2864 пациентов), показывает прогностическое значение TG2 для этих злокачественных новообразований. Было выявлено, что высокий уровень TG2 на уровне как мРНК, так и белка соответствует низким показателям общей выживаемости [120].

Данные об участии TG2 в онкогенезе представлены в табл. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приобретение клетками злокачественности характеризуется как изменениями во внешних белковых

взаимодействиях и реорганизации ВКМ, так и дестабилизацией процессов выживания и гибели. Известно, что аутофагия может играть двойственную роль в онкогенезе, способствуя подавлению проапоптотических сигналов и выживанию опухолевых клеток. Кроме того, мутации в онкосупрессорах, регулирующих экспрессию важнейших участников, стабилизирующих клеточный гомеостаз, также стимулируют нарушение баланса аутофагия/апоптоз. Обнаружение и изучение функций молекулярных узлов перекрестного взаимодействия могут способствовать расширению представлений о регуляции данных процессов. Одним из них является многофункциональный фермент TG2, являющийся координатором оси ВКМ – апоптоз – аутофагия. Разработка тканеспецифичных селективных агентов, направленных на модуляцию определенных активностей TG2, может способствовать повышению сенсibilизации опухолевых клеток к обработке генотоксическими препаратами и, как следствие, клеточной гибели.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Brauer H.A., Makowski L., Hoadley K.A. et al. Impact of tumor microenvironment and epithelial phenotypes on metabolism in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(3):571–85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2123
2. Lee H.-M., Lee H.-J., Chang J.-E. Inflammatory cytokine: an attractive target for cancer treatment. *Biomedicines* 2022;10(9):2116. DOI: 10.3390/biomedicines10092116
3. Tian H., Shi H., Yu J. et al. Biophysics role and biomimetic culture systems of ECM stiffness in cancer EMT. *Global Challenges* 2022;6(6):2100094. DOI: 10.1002/gch2.202100094
4. Odii B.O., Coussons P. Biological functionalities of transglutaminase 2 and the possibility of its compensation by other members of the transglutaminase family. *Sci World J* 2014;2014. DOI: 10.1155/2014/714561
5. Suzuki K., Ikebuchi H., Terao T. Mercuric and cadmium ions stimulate phosphorylation of band 4.2 protein on human erythrocyte membranes. *J Biol Chem* 1985;260(7):4526–30. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)89295-X
6. Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z. et al. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 2011;91(3):931–72. DOI: 10.1152/physrev.00016.2010
7. Kárpáti S., Sárdy M., Németh K. et al. Transglutaminases in autoimmune and inherited skin diseases: the phenomena of epitope spreading and functional compensation. *Exp Dermatol* 2018;27(8):807–14. DOI: 10.1111/exd.13449
8. Kiritsi D., Cosgarea I., Franzke C.-W. et al. Acral peeling skin syndrome with TGM5 gene mutations may resemble epidermolysis bullosa simplex in young individuals. *J Invest Dermatol* 2010;130(6):1741–6. DOI: 10.1038/jid.2010.23
9. John S., Thiebach L., Frie C. et al. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PLoS One* 2012;7(4):e34252. DOI: 10.1371/journal.pone.0034252
10. Dean M.D. Genetic disruption of the copulatory plug in mice leads to severely reduced fertility. *PLoS Genet* 2013;9(1):e1003185 PMID: 23341775. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003185
11. Csobán-Szabó Z., Bécsi B., El Alaoui S. et al. Biochemical characterisation of human transglutaminase 4. *Int J Mol Sci* 2021;22(22):12448. DOI: 10.3390/ijms222212448
12. Schulze-Krebs A., Canneva F., Stemick J. et al. Transglutaminase 6 is colocalized and interacts with mutant huntingtin in Huntington disease rodent animal models. *Int J Mol Sci* 2021;22(16):8914. DOI: 10.3390/ijms22168914
13. Martin T.A., Gomez K., Watkins G. et al. Expression of breast cancer specific gene-1 (BCSG-1/ γ -synuclein) is associated with tumor grade but not with clinical outcome of patients with breast cancer. *Oncol Rep* 2006;16(1):207–12. DOI: 10.3892/or.16.1.207
14. Soluri M.F., Boccafoschi F., Cotella D. et al. Mapping the minimum domain of the fibronectin binding site on transglutaminase 2 (TG2) and its importance in mediating signaling, adhesion, and migration in TG2-expressing cells. *FASEB J* 2019;33(2):2327–42. DOI: 10.1096/fj.201800054RRR
15. Belkin A.M. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J* 2011;278(24):4704–16. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x
16. Telci D., Wang Z., Li X. et al. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and β 1 integrin co-signaling. *J Biol Chem* 2008;283(30):20937–47. DOI: 10.1074/jbc.M801763200
17. Janiak A., Zemskov E.A., Belkin A.M. Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2006;17(4):1606–19. DOI: 10.1091/mbc.e05-06-0549
18. Jambrovics K., Botó P., Pap A. et al. Transglutaminase 2 associated with PI3K and PTEN in a membrane-bound signalosome platform blunts cell death. *Cell Death Dis* 2023;14(3):217. DOI: 10.1038/s41419-023-05748-6
19. Wang Z., Perez M., Lee E.-S. et al. The functional relationship between transglutaminase 2 and transforming growth factor β 1 in the regulation of angiogenesis and endothelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 2017;8(9):e3032-e. DOI: 10.1038/cddis.2017.399
20. Kumar S., Mehta K. Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1 α promoter and nuclear factor- κ B via a non-canonical pathway. *PLoS One* 2012;7(11):e49321. DOI: 10.1371/journal.pone.0049321
21. Biri B., Kiss B., Király R. et al. Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2. *Biochem J* 2016;473(1):31–42. DOI: 10.1042/BJ20150843

22. Xu D., Xu N., Sun L. et al. TG2 as a novel breast cancer prognostic marker promotes cell proliferation and glycolysis by activating the MEK/ERK/LDH pathway. *BMC Cancer* 2022;22(1):1267. PMID: 36471278. DOI: 10.1186/s12885-022-10364-2
23. Jia C., Wang G., Wang T. et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition via the TRANSGLUTAMINASE 2-dependent IL-6/IL6R/STAT3 axis in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Sci* 2020;16(14):2542. DOI: 10.7150/ijbs.45446
24. Rossin F., Costa R., Bordi M. et al. Transglutaminase type 2 regulates the Wnt/ β -catenin pathway in vertebrates. *Cell Death Dis* 2021;12(3):249. DOI: 10.1038/s41419-021-03485-2
25. Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434(7035):843–50. DOI: 10.1038/nature03319
26. Tammela T., Sanchez-Rivera F.J., Cetinbas N.M. et al. A Wnt-producing niche drives proliferative potential and progression in lung adenocarcinoma. *Nature* 2017;545(7654):355–9. DOI: 10.1038/nature22334
27. Huang H., Chen Z., Ni X. Tissue transglutaminase-1 promotes stemness and chemoresistance in gastric cancer cells by regulating Wnt/ β -catenin signaling. *Exp Biol Med* 2017;242(2):194–202. DOI: 10.1177/1535370216670541
28. Thangaraju K., Király R., Demeny M.A. et al. Genomic variants reveal differential evolutionary constraints on human transglutaminases and point towards unrecognized significance of transglutaminase 2. *PLoS One* 2017;12(3):e0172189. DOI: 10.1371/journal.pone.0172189
29. Al-U'datt D.A.G., Tranchant C.C., Al-Husein B. et al. Involvement and possible role of transglutaminases 1 and 2 in mediating fibrotic signalling, collagen cross-linking and cell proliferation in neonatal rat ventricular fibroblasts. *PLoS One* 2023;18(2):e0281320. DOI: 10.1371/journal.pone.0281320
30. Fesus L., Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 2002;27(10):534–9. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02182-5
31. Mishra S., Murphy L.J. Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase. *J Biol Chem* 2004;279(23):23863–8. DOI: 10.1074/jbc.M311919200
32. Akimov S.S., Belkin A.M. Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGF β -dependent matrix deposition. *J Cell Sci* 2001;114(16):2989–3000. DOI: 10.1242/jcs.114.16.2989
33. Liu S., Cerione R.A., Clardy J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(5):2743–7. DOI: 10.1073/pnas.042454899
34. Shrestha R., Tatsukawa H., Ishibashi N. et al. Molecular mechanism by which acyclic retinoid induces nuclear localization of transglutaminase 2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 2015;6(12):e2002. DOI: 10.1038/cddis.2015.339
35. Begg G.E., Carrington L., Stokes P.H. et al. Mechanism of allosteric regulation of transglutaminase 2 by GTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(52):19683–8. DOI: 10.1073/pnas.0609283103
36. Király R., Demény M., Fésüs L. Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca²⁺-dependent action of a multifunctional protein. *FEBS J* 2011;278(24):4717–39. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08345.x
37. Lai T.-S., Greenberg C.S. TGM2 and implications for human disease: role of alternative splicing. *Front Biosci* 2013;18(2):504. DOI: 10.2741/4117
38. Tee A.E., Marshall G.M., Liu P.Y. et al. Opposing effects of two tissue transglutaminase protein isoforms in neuroblastoma cell differentiation 2. *J Biol Chem* 2010;285(6):3561–7. DOI: 10.1074/jbc.M109.053041
39. Lai T.-S., Liu Y., Li W. et al. Identification of two GTP-independent alternatively spliced forms of tissue transglutaminase in human leukocytes, vascular smooth muscle, and endothelial cells. *FASEB J* 2007;21(14):4131. DOI: 10.1096/fj.06-7598com
40. Kuo T.F., Tatsukawa H., Kojima S. New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. *FEBS J* 2011;278(24):4756–67. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08409.x
41. Altuntas S., D'Eletto M., Rossin F. et al. Type 2 transglutaminase, mitochondria and Huntington's disease: manage a trois. *Mitochondrion* 2014;19:97–104. DOI: 10.1016/j.mito.2014.09.008
42. Pavez-Giani M.G., Sánchez-Aguilera P.I., Bomer N. et al. Atpase inhibitory factor-1 disrupts mitochondrial Ca²⁺ handling and promotes pathological cardiac hypertrophy through camkii δ . *Int J Mol Sci* 2021;22(9):4427. PMID: 33922643. DOI: 10.3390/ijms22094427
43. Rossin F., D'eletto M., Falasca L. et al. Transglutaminase 2 ablation leads to mitophagy impairment associated with a metabolic shift towards aerobic glycolysis. *Cell Death Differ* 2015;22(3):408–18. DOI: 10.1038/cdd.2014.106
44. Kawajiri S., Saiki S., Sato S. et al. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* 2010;584(6):1073–9. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.016
45. Lénárt K., Bankó C., Ujlaki G. et al. Tissue transglutaminase knock-out preadipocytes and beige cells of epididymal fat origin possess decreased mitochondrial functions required for thermogenesis. *Int J Mol Sci* 2022;23(9):5175. DOI: 10.3390/ijms23095175
46. Piacentini M., Grazia Farrace M., Piredda L. et al. Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *J Neurochem* 2002;81(5):1061–72. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2002.00898.x
47. Rodolfo C., Mormone E., Matarrese P. et al. Tissue transglutaminase is a multifunctional BH3-only protein. *J Biol Chem* 2004;279(52):54783–92. DOI: 10.1074/jbc.M410938200
48. Cho S.-Y., Lee J.-H., Bae H.-D. et al. Transglutaminase 2 inhibits apoptosis induced by calcium overload through down-regulation of Bax. *Exp Mol Med* 2010;42(9):639–50. DOI: 10.3858/emmm.2010.42.9.063
49. D'Eletto M., Grazia Farrace M., Falasca L. et al. Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation. *Autophagy* 2009;5(8):1145–54. DOI: 10.4161/auto.5.8.10040
50. D'Eletto M., Farrace M., Rossin F. et al. Type 2 transglutaminase is involved in the autophagy-dependent clearance of ubiquitinated proteins. *Cell Death Differ* 2012;19(7):1228–38. DOI: 10.1038/cdd.2012.2
51. Rossin F., D'Eletto M., Macdonald D. et al. TG2 transamidating activity acts as a reostat controlling the interplay between apoptosis and autophagy. *Amino Acids* 2012;42:1793–802. DOI: 10.1007/s00726-011-0899-x
52. Kang J., Lee J., Hong D. et al. Renal cell carcinoma escapes death by p53 depletion through transglutaminase 2-chaperoned autophagy. *Cell Death Dis* 2016;7(3):e2163. DOI: 10.1038/cddis.2016.14
53. Malkomes P., Lunger I., Oppermann E. et al. Transglutaminase 2 promotes tumorigenicity of colon cancer cells by inactivation of the tumor suppressor p53. *Oncogene* 2021;40(25):4352–67. DOI: 10.1038/s41388-021-01847-w
54. Lamore S.D., Wondrak G.T. Autophagic-lysosomal dysregulation downstream of cathepsin B inactivation in human skin fibroblasts exposed to UVA. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11(1):163–72. DOI: 10.1039/c1pp05131h
55. Oliverio S., Amendola A., Di Sano F. et al. Tissue transglutaminase-dependent posttranslational modification of the retinoblastoma gene product in promonocytic cells undergoing apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17(10):6040–8. DOI: 10.1128/MCB.17.10.6040
56. Mishra S., Melino G., Murphy L.J. Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 2007;282(25):18108–15. DOI: 10.1074/jbc.M607413200

57. Wang Y., Ande S.R., Mishra S. Phosphorylation of transglutaminase 2 (TG2) at serine-216 has a role in TG2 mediated activation of nuclear factor-kappa B and in the downregulation of PTEN. *BMC Cancer* 2012;12:1–12. DOI: 10.1186/1471-2407-12-277
58. Akar U., Ozpolat B., Mehta K. et al. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res* 2007;5(3):241–9. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0229
59. Park K.-S., Han B.-G., Lee K.H. et al. Depletion of nucleophosmin via transglutaminase 2 cross-linking increases drug resistance in cancer cells. *Cancer Lett* 2009;274(2):201–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.007
60. Wu J., Wang J., Wang L. et al. Topical retinoic acid induces corneal strengthening by upregulating transglutaminase 2 in murine cornea. *Exp Eye Res* 2022;214:108850. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108850
61. Kuncio G.S., Tsyganskaya M., Zhu J. et al. TNF- α modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. *Am J Physiol* 1998;274(2):G240–5. DOI: 10.1152/ajpgi.1998.274.2.G240
62. Brown K.D. Transglutaminase 2 and NF- κ B: an odd couple that shapes breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(2):329–36. DOI: 10.1007/s10549-012-2351-7
63. Jang G.-Y., Jeon J.-H., Cho S.-Y. et al. Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF- κ B activity in hypoxic tumor cells. *Oncogene* 2010;29(3):356–67. DOI: 10.1038/onc.2009.342
64. Suto N., Ikura K., Sasaki R. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268(10):7469–73.
65. Bayardo M., Punzi F., Bondar C. et al. Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- γ and tumor necrosis factor- α in human small intestine. *Clin Exp Immunol* 2012;168(1):95–104. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04545.x
66. Piacentini M., D'Eletto M., Farrace M.G. et al. Characterization of distinct sub-cellular location of transglutaminase type II: changes in intracellular distribution in physiological and pathological states. *Cell Tissue Res* 2014;358(3):793–805. DOI: 10.1007/s00441-014-1990-x
67. Mishra S., Saleh A., Espino P.S. et al. Phosphorylation of histones by tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 2006;281(9):5532–8. DOI: 10.1074/jbc.M506864200
68. Ballestar E., Abad C., Franco L. Core histones are glutaminylation substrates for tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 1996;271(31):18817–24. DOI: 10.1074/jbc.271.31.18817
69. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(3):460–73. DOI: 10.1089/ars.2013.5371
70. Lu G., Wang Y., Shi Y. et al. Autophagy in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic target. *MedComm* 2022;3(3):e150. DOI: 10.1002/mco2.150
71. Bhutia S.K., Mukhopadhyay S., Sinha N. et al. Autophagy: cancer's friend or foe? *Adv Cancer Res* 2013;118:61–95. DOI: 10.1016/B978-0-12-407173-5.00003-0
72. Su M., Mei Y., Sinha S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *J Oncol* 2013;2013:102735. DOI: 10.1155/2013/102735
73. Kroemer G., Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(12):1004–10. DOI: 10.1038/nrm2527
74. Maiuri M.C., Tasdemir E., Ciriollo A. et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* 2009;16(1):87–93. DOI: 10.1038/cdd.2008.131
75. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
76. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019;20(3):175–93. DOI: 10.1038/s41580-018-0089-8
77. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337
78. Chaitanya G.V., Alexander J.S., Babu P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 2010;8:1–11. DOI: 10.1186/1478-811X-8-31
79. Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumor suppression? *Cell Death Differ* 2018;25(1):104–13. DOI: 10.1038/cdd.2017.169
80. Fan Y., Ullman E., Zong W.-X. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Beyond Apoptosis* 2008:141–56. DOI: 10.5732/cjc.012.10106
81. Villella V.R., Esposito S., Bruscia E.M. et al. Targeting the intracellular environment in cystic fibrosis: restoring autophagy as a novel strategy to circumvent the CFTR defect. *Front Pharmacol* 2013;4:1. DOI: 10.3389/fphar.2013.00001
82. Boehm J.E., Singh U., Combs C. et al. Tissue transglutaminase protects against apoptosis by modifying the tumor suppressor protein p110 Rb. *J Biol Chem* 2002;277(23):20127–30. DOI: 10.1074/jbc.C200147200
83. Han J.A., Park S.C. Transglutaminase-dependent modulation of transcription factor Sp1 activity. *Mol Cells* 2000;10:612–8. DOI: 10.1007/s10059-000-0612-5
84. Tatsukawa H., Sano T., Fukaya Y. et al. Dual induction of caspase 3- and transglutaminase-dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer* 2011;10:1–11. DOI: 10.1186/1476-4598-10-4
85. Yamaguchi H., Wang H.-G. Tissue transglutaminase serves as an inhibitor of apoptosis by cross-linking caspase 3 in thapsigargin-treated cells. *Mol Cell Biol* 2006;26(2):569–79. DOI: 10.1128/MCB.26.2.569-579.2006
86. Chène P. Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(2):102–9. DOI: 10.1038/nrc991
87. Kang J.H., Lee S.-H., Cheong H. et al. Transglutaminase 2 promotes autophagy by LC3 induction through p53 depletion in cancer cell. *Biomol Ther (Seoul)* 2019;27(1):34. DOI: 10.4062/biomolther.2018.140
88. Lee S.-H., Kang J.H., Ha J.S. et al. Transglutaminase 2-mediated p53 depletion promotes angiogenesis by increasing HIF-1 α -p300 binding in renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020;21(14):5042. DOI: 10.3390/ijms21145042
89. Xia L., Tan S., Zhou Y. et al. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* 2018;2063–73. DOI: 10.2147/OTTS161109
90. Lee J., Kim Y.-S., Choi D.-H. et al. Transglutaminase 2 induces nuclear factor- κ B activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J Biol Chem* 2004;279(51):53725–35. DOI: 10.1074/jbc.M407627200
91. Kim J., Lee S., Park J. et al. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. *Cell Death Differ* 2010;17(9):1420–34. DOI: 10.1038/cdd.2010.19
92. Verma A., Guha S., Wang H. et al. Tissue transglutaminase regulates focal adhesion kinase/AKT activation by modulating PTEN expression in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(7):1997–2005. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1533
93. D'Eletto M., Rossin F., Fedorova O. et al. Transglutaminase type 2 in the regulation of proteostasis. *Biol Chem* 2019;400(2):125–40. DOI: 10.1515/hsz-2018-0217
94. Gagliardi M., Saverio V., Rossin F. et al. Transglutaminase 2 and ferroptosis: a new liaison? *Cell Death Discov* 2023;9(1):88. DOI: 10.1038/s41420-023-01394-1
95. Erdem M., Erdem S., Sanli O. et al. Up-regulation of TGM2 with ITGB1 and SDC4 is important in the development and metastasis of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2014;32(1):25e13–25.
96. Erdem S., Yegen G., Telci D. et al. The increased transglutaminase 2 expression levels during initial tumorigenesis predict increased risk of metastasis and decreased disease-free and cancer-specific survivals in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2015;33(10):1553–60. DOI: 10.1007/s00345-014-1462-7

97. Park M.J., Baek H.W., Rhee Y.-Y. et al. Transglutaminase 2 expression and its prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol Trans Med* 2015;49(1):37–43. DOI: 10.4132/jptm.2014.10.25
98. Gupta S., Garg S., Kumar V. et al. Study of tumor transglutaminase 2 expression in gallbladder cancer – is it a novel predictor of survival? *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg* 2020;24(4):460–8. DOI: 10.14701/ahbps.2020.24.4.460
99. Wang X., Yu Z., Zhou Q. et al. Tissue transglutaminase-2 promotes gastric cancer progression via the ERK1/2 pathway. *Oncotarget* 2016;7(6):7066. DOI: 10.18632/oncotarget.6883
100. Cho S.-Y., Oh Y., Jeong E.M. et al. Amplification of transglutaminase 2 enhances tumor-promoting inflammation in gastric cancers. *Exp Mol Med* 2020;52(5):854–64. DOI: 10.1038/s12276-020-0444-7
101. Leicht D.T., Kausar T., Wang J. et al. TGM2: a cell surface marker in esophageal adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2014;9(6):872–81. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000229
102. Kausar T., Sharma R., Hasan M.R. et al. Clinical significance of GPR56, transglutaminase 2, and NF- κ B in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2011;29(1):42–8. DOI: 10.3109/07357907.2010.512597
103. Jin T., Lin H.-X., Lin H. et al. Expression TGM2 and BNIP3 have prognostic significance in laryngeal cancer patients receiving surgery and postoperative radiotherapy: a retrospective study. *J Transl Med* 2012;10:1–9. DOI: 10.1186/1479-5876-10-64
104. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K. et al. TGM2 is a novel marker for prognosis and therapeutic target in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010;17(4):967–72. DOI: 10.1245/s10434-009-0865-y
105. Fernández-Aceñero M.J., Torres S., Garcia-Palmero I. et al. Prognostic role of tissue transglutaminase 2 in colon carcinoma. *Virchows Arch* 2016;469(6):611–9. DOI: 10.1007/s00428-016-2020-z
106. Torres A., Pac-Sosińska M., Wiktor K. et al. CD44, TGM2 and EpCAM as novel plasma markers in endometrial cancer diagnosis. *BMC Cancer* 2019;19(1):1–11. DOI: 10.1186/s12885-019-5556-x
107. Lan T., Mu C., Wang Z. et al. Diagnostic and prognostic values of serum EpCAM, TGM2, and HE4 levels in endometrial cancer. *Front Oncol* 2020;10:1697. DOI: 10.3389/fonc.2020.01697
108. Lehrer S., Rheinstein P.H. Druggable genetic targets in endometrial cancer. *Cancer Treat Res Commun* 2022;30:100502. DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100502
109. Huang Y.-C., Wei K.-C., Chang C.-N. et al. Transglutaminase 2 expression is increased as a function of malignancy grade and negatively regulates cell growth in meningioma. *PLoS One* 2014;9(9):e108228. DOI: 10.1371/journal.pone.0108228
110. Harb O.A., Elsayed W.S., Ismail E.I. et al. Thioredoxin-interacting-protein [TXNIP] and transglutaminase 2 [TGM2] expression in meningiomas of different grades and the role of their expression in meningioma recurrence and prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(8):2299. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.8.2299
111. Zheng W., Chen Q., Liu H. et al. SDC1-dependent TGM2 determines radiosensitivity in glioblastoma by coordinating EPG5-mediated fusion of autophagosomes with lysosomes. *Autophagy* 2023;19(3):839–57. DOI: 10.1080/15548627.2022.2105562
112. Muccioli S., Ciaccio R., Brillo V. et al. Promising prognostic value of transglutaminase type 2 and its correlation with tumor-infiltrating immune cells in skin cutaneous melanoma. *Cell Death Discov* 2022;8(1):294. DOI: 10.1038/s41420-022-01087-1
113. Pierce A., Whetton A.D., Meyer S. et al. Transglutaminase 2 expression in acute myeloid leukemia: association with adhesion molecule expression and leukemic blast motility. *Proteomics* 2013;13(14):2216–24. DOI: 10.1002/pmic.201200471
114. Mohammadzadeh Z., Omidkhoda A., Chahardouli B. et al. The impact of ICAM-1, CCL2 and TGM2 gene polymorphisms on differentiation syndrome in acute promyelocytic leukemia. *BMC Cancer* 2021;21(1):1–7. DOI: 10.1186/s12885-021-07783-y
115. Jeong J.-H., Cho B.C., Shim H.S. et al. Transglutaminase 2 expression predicts progression free survival in non-small cell lung cancer patients treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *J Korean Med Sci* 2013;28(7):1005–14. DOI: 10.3346/jkms.2013.28.7.1005
116. Chihong Z., Yutian L., Danying W. et al. Prognostic value of transglutaminase 2 in non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget* 2017;8(28):45577. DOI: 10.18632/oncotarget.17374
117. Assi J., Srivastava G., Matta A. et al. Transglutaminase 2 overexpression in tumor stroma identifies invasive ductal carcinomas of breast at high risk of recurrence. *PLoS One* 2013;8(9):e74437. DOI: 10.1371/journal.pone.0074437
118. Mangala L.S., Arun B., Sahin A.A. et al. Tissue transglutaminase-induced alterations in extracellular matrix inhibit tumor invasion. *Mol Cancer* 2005;4(1):1–8. DOI: 10.1186/1476-4598-4-33
119. Oh K., Ko E., Kim H.S. et al. Transglutaminase 2 facilitates the distant hematogenous metastasis of breast cancer by modulating interleukin-6 in cancer cells. *Breast Cancer Res* 2011;13(5):1–12. DOI: 10.1186/bcr3034
120. Gao J., Wang S., Wan H. et al. Prognostic value of transglutaminase 2 in patients with solid tumors: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2023;27(2):36–43. DOI: 10.1089/gtmb.2022.0088

Вклад авторов

Ю.А. Гненная, О.М. Семёнов, Н.А. Барлев: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

Y.A. Gnennaya, O.M. Semenov, N.A. Barlev: the main author, literature review on the topic of the article, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ю.А. Гненная / Yu.A. Gnennaya: <https://orcid.org/0000-0002-3571-333X>

О.М. Семёнов / O.M. Semenov: <https://orcid.org/0000-0003-2042-361X>

Н.А. Барлев / N.A. Barlev: <https://orcid.org/0000-0001-7111-2446>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук».

Funding. The work was carried out as part of the execution of state scientific program to the Institute of Biomedical Chemistry.

Статья поступила: 11.08.2022. **Принята к публикации:** 25.09.2023.

Article submitted: 11.08.2022. **Accepted for publication:** 25.09.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-47-60>

Интеграция сигнальных каскадов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$): роль в реализации терапевтической неэффективности тамоксифена

Н.Н. Бабышкина^{1,2}, И.А. Узьянбаев², Т.А. Дронова¹, Н.В. Чердынцева¹

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

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

Контакты: Наталия Николаевна Бабышкина nbabyshkina@mail.ru

Функционирование сигнальных каскадов факторов роста, их взаимодействие с центральными регуляторными мишенями опухолевых клеток и эстрогенами рассматриваются в качестве основных механизмов, опосредующих развитие гормональной резистентности при раке молочной железы. Результатом интеграции сигнального пути трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) и PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/Akt (протеинкиназа B)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) может являться активация пролиферативных процессов в клетках молочной железы и, как следствие, неэффективный ответ на терапию и прогрессирование заболевания. В обзоре представлен систематический анализ данных литературы, посвященной роли TGF- $\beta 1$ -сигнального пути в механизмах резистентности к тамоксифену в аспекте взаимодействия с каскадом PI3K/Akt/mTOR. Рассмотрены особенности взаимодействия сигнального пути рецепторов эстрогенов α , механизмы регуляторной активации TGF- $\beta 1$ и PI3K/Akt/mTOR, а также их вклад в реализацию ответа на тамоксифен. Непосредственное вовлечение TGF- $\beta 1$ /PI3K в развитие устойчивости к данному препарату определяет перспективы изучения белков-эффекторов этих каскадов в качестве молекулярных мишеней. Накопленные к настоящему времени данные позволяют рассматривать сигнальный путь TGF- $\beta 1$ /PI3K как потенциальный молекулярный инструмент для поиска эффективных стратегий блокирования резистентности опухолевых клеток к тамоксифену.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста $\beta 1$, PI3K/Akt/mTOR, рак молочной железы, эстрогеновые рецепторы, тамоксифен, резистентность

Для цитирования: Бабышкина Н.Н., Узьянбаев И.А., Дронова Т.А., Чердынцева Н.В. Интеграция сигнальных каскадов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$): роль в реализации терапевтической неэффективности тамоксифена. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):47–60. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-47-60>

Integration of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) signaling cascades: role in the therapeutic inefficiency of tamoxifen

N.N. Babyskhina^{1,2}, I.A. Uzyanbaev², T.A. Dronova¹, N.V. Cherdynitseva¹

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

²Siberian State Medical University; 2 Moskovsky Trakt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Nataliya Nikolaevna Babyskhina nbabyshkina@mail.ru

Growth factors signaling cascades and their interaction with the central regulatory targets of tumor cells and estrogens are considered as the main mechanisms of hormonal resistance in breast cancer. The integration of the transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt (protein kinase B)/mTOR (mammalian target

of rapamycin) signaling pathway may result in the activation of proliferation and, as a result, the development of an ineffective response to therapy and disease progression. The review summarizes a systematic analysis of the literature data on the role of TGF- β 1 signaling in the mechanisms of tamoxifen resistance to in the aspect of interaction with the PI3K/Akt/mTOR. The interaction between the estrogen receptors α signaling and tamoxifen, the mechanisms of regulatory activation of TGF- β 1 and PI3K/Akt/mTOR, as well as their contribution to the tamoxifen response are considered. The direct involvement of TGF- β 1/PI3K in the mechanisms of tamoxifen resistance to determines the prospects for studying the effector of these cascades as molecular targets. The knowledge accumulated to date allows considering the TGF- β 1/PI3K signaling pathway as a potential molecular tool for the search for effective strategies for blocking the resistance of tumor cells to tamoxifen.

Keywords: transforming growth factor β 1, PI3K/Akt/mTOR, breast cancer, estrogen receptors, tamoxifen, resistance

For citation: Babyshkina N.N., Uzyanbaev I.A., Dronova T.A., Cherdyntseva N.V. Integration of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling cascades: role in the therapeutic inefficiency of tamoxifen. *Uspehi Molekularnoj Onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):47–60. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-47-60>

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (PMЖ) является широко распространенным злокачественным новообразованием и основной причиной смерти от рака у женщин как в РФ, так и во всем мире [1, 2]. В 70 % случаев PMЖ обнаруживается экспрессия рецепторов эстрогенов α (ER α) и/или рецепторов прогестерона (PR). Такие опухоли считаются гормонположительными и имеют высокий клинический ответ на гормональную терапию. Согласно рекомендациям по лечению PMЖ St. Gallen (2021), основным препаратом для лечения гормонположительного PMЖ без амплификации рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2) является тамоксифен [3]. Это лекарственное средство относится к классу селективных модификаторов рецепторов эстрогенов. Механизм действия тамоксифена основан на блокировании транскрипционной активности ER α путем прямого связывания с ним [4]. Феномен неэффективного клинического ответа на данный препарат хорошо известен и связан с генетическими, эпигенетическими и фенотипическими изменениями, приводящими к росту опухоли. Среди многочисленных механизмов, опосредующих развитие гормональной резистентности, большую роль в этом процессе играют функционирование сигнальных каскадов факторов роста и их взаимодействие с центральными регуляторными мишенями опухолевых клеток и эстрогенами.

Мультифункциональная природа трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) позволяет рассматривать этот цитокин в качестве индуктора и ингибитора опухолевого роста [5]. Его противоопухолевая активность впервые продемонстрирована в экспериментах *in vivo* [6]. В исследованиях *in vitro* показана способность клеточных линий PMЖ к продукции TGF- β 1, что приводит к развитию резистентности к эстрогенам [7]. Показано, что эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), индуцированный TGF- β 1, ассоциирован с процессами инвазии опухолевых клеток через активацию сигнального пути PI3K (фосфо-

инозитид-3-киназа)/Akt (протеинкиназа B)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) [8]. Существуют экспериментальные подтверждения вклада TGF- β 1/PI3K-опосредованной активации в формирование резистентных к тамоксифену опухолевых линий рака молочной PMЖ [9].

В настоящем обзоре обобщены данные о роли TGF- β 1-сигнального пути в развитии резистентности к тамоксифену в аспекте взаимодействия с PI3K/Akt/mTOR-каскадом, представлены данные о вкладе TGF- β 1/PI3K в реализацию ответа на данный препарат.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ И ТАМОКСИФЕН: МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Эстроген-рецепторный комплекс играет решающую роль в развитии и прогрессировании PMЖ. Эффекты эстрогенов реализуются посредством 2 основных путей: классического (ядерного) и альтернативного (неядерного) [10]. Как стероидные гормоны эстрогены могут проникать через цитоплазматическую мембрану и взаимодействовать с внутриклеточными ER α и ER β , опосредуя прямое воздействие через связывание с последовательностями ДНК [11]. Рецепторы эстрогенов α состоят из 595 аминокислотных остатков, имеют массу 67 кДа, а рецепторы эстрогенов β (ER β) включают 530 аминокислот и имеют молекулярную массу 59 кДа [12]. В процессе передачи сигнала ER α и ER β действуют как лиганд-зависимые факторы транскрипции. В цитоплазме при связывании эстрадиола (E2) с ER α или ER β происходят их конформационные изменения с последующей димеризацией соответствующего рецептора [13]. Комплексы E2/ER α и E2/ER β направляются в ядро, где происходит их связывание с ERE-последовательностями энхансерных областей промоторов и/или 3-нетранслируемых областей генов-мишеней [14].

В ходе экспериментов было показано, что ERE-зависимая транскрипция генов опосредована не только классическими внутриклеточными рецепторами, но и мембранными рецепторами, классическими ER α

и ERβ или иными типами рецепторов, например рецепторами, связанными с G-белком (GPR30) [15–17]. Связывание E2 с GPR30 ведет к повышению концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), мобилизации кальция и с-Src, что, в свою очередь, опосредует активацию матриксных металлопротеиназ (MMPs). Они расщепляют гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF). Далее свободный HB-EGF трансактивирует рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR). Они активируют сигнальные пути MAPK и PI3K/Akt, которые определяют быстрые (негеномные) или геномные эффекты посредством регуляции транскрипции генов [18]. Альтернативно активированные ERα модулируют активность факторов транскрипции посредством белок-белковых взаимодействий. Эстрогеновые рецепторы α, расположенные на плазматической мембране и активируемые E2, взаимодействуют с адапторными белками и сигнальными молекулами, такими как с-Src, которые опосредуют быструю передачу сигналов через пути PI3K и MAPK (рис. 1).

Связывание 4-гидрокситамоксифена (4-ОНТ) с ERα приводит к стабилизации связывания комплекса ERα/тамоксифен с корепрессорными белками, из которых ведущую роль играют NCoR и SMRT [19]. Они имеют небольшую массу – 270 кДа. С-концевая область этих белков содержит домены взаимодействия

с ядерным рецептором [20]. Известно, что NCoR регулирует ERα-зависимую транскрипцию. Механизм активности тамоксифена можно частично объяснить способностью к стабилизации связывания ERα с данными корепрессорами [21–23]. Для реализации своего противоопухолевого эффекта данный препарат нуждается в другом белке – PAX2. В экспериментальных исследованиях показано, что PAX2 и коактиватор ERα AIB-1/SRC-3 конкурируют за связывание и регуляцию транскрипции HER2, что определяет последующее действие тамоксифена в клетках РМЖ [24].

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА β1

Трансформирующий фактор роста β1 является цитокином, принадлежащим к суперсемейству трансформирующего ростового фактора, которое содержит более 30 типов цитокинов, включая активины, ингибины, костный морфогенетический белок [25]. Биологическая активность TGF-β многогранна: от регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и миграции до модуляции воспаления, процессов заживления ран, иммунного гомеостаза и толерантности [26]. Трансформирующий фактор роста β1 синтезируется в виде мономера пре- и про-TGF-β1, состоящего из 390 аминокислотных остатков и включающего N-концевой сигнальный пептид из 29 аминокислот, пептид,

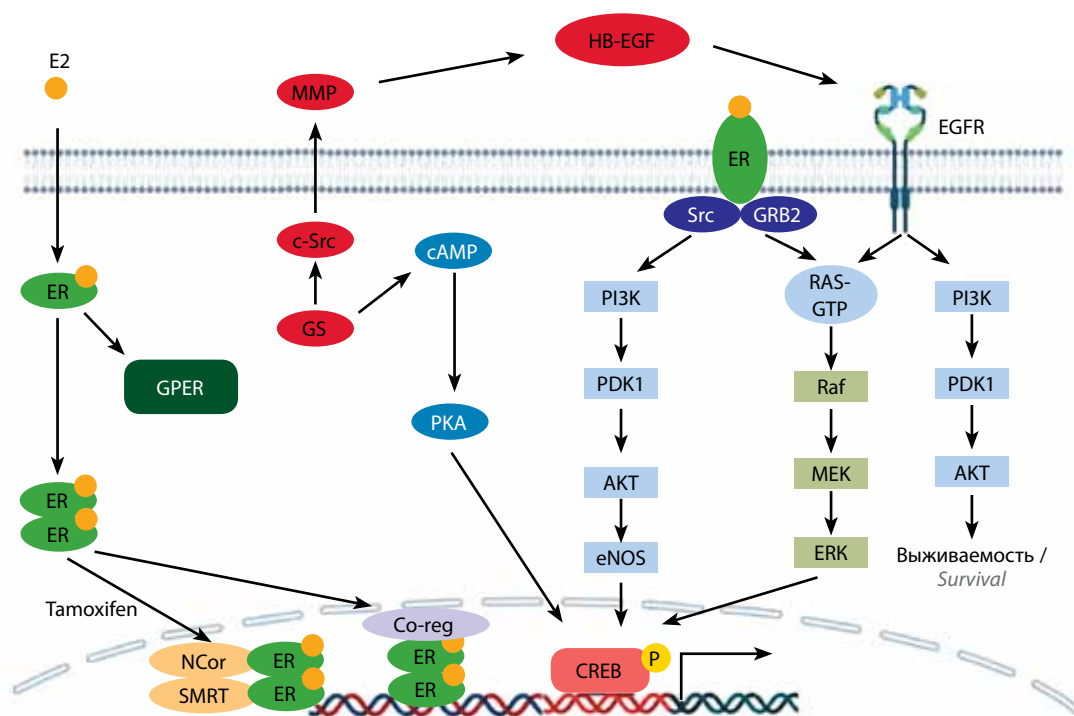


Рис. 1. Молекулярные механизмы взаимодействия сигнального пути эстрогенового рецептора α и тамоксифена (рисунок создан с использованием Bio-Render.com). ER – эстрогеновый рецептор; MMPs – матриксные металлопротеиназы; HB-EGF – гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; AKT – протеинкиназа B

Fig. 1. Molecular mechanisms of interaction between the estrogen receptor signaling and tamoxifen (created with Bio-Render.com). ER – estrogen receptor; MMPs – matrix metalloproteinases; HB-EGF – heparin-binding epidermal growth factor; PI3K – phosphoinositide-3-kinase; eNOS – endothelial nitric oxide synthase; EGFR – epidermal growth factor receptor; AKT – protein kinase B

ассоциированный с латентностью (LAP), из 249 аминокислот и С-концевую последовательность из 112 аминокислот, соответствующую зрелому TGF- β 1 [27]. В результате димеризации образуется про-TGF- β 1-гомодимер, происходит его расщепление в аппарате Гольджи фуринконвертазой по 278 и 279 аминокислотным остаткам, что приводит к разделению LAP и зрелого TGF- β 1-гомодимера. Гомодимеры составляют небольшой латентный комплекс (SLC), к которому ковалентно присоединяется TGF-связывающий белок (LTBP) с образованием большого латентного комплекса (LLC). После секреции LLC связывается с внеклеточным матриксом и сохраняется до активации, которая определяется наличием ферментов, а также уровнем pH и индуцированной облучением продукцией активных форм кислорода [28, 29].

Существуют 2 группы рецепторов TGF- β R. Рецепторы 1-й группы распознают и связывают LAP как часть LLC или SLC. Они опосредованно участвуют в реализации конформационных изменений в димере LAP, результатом которых является высвобождение активированного TGF- β . Во 2-ю группу входят 3 типа мембранных рецепторов, связывающих активный TGF- β . Передача внутриклеточного сигнала осуществляется с помощью рецепторов 1-го и 2-го типов. Рецепторы 3-го типа представляют собой β -гликан и эндоглин [30], действующие как ингибиторы активного TGF- β и предотвращающие связывание TGF- β 1 с рецептором 2-го типа. При связывании с клеточной по-

верхностью рецептор 3-го типа облегчает связывание TGF- β с рецептором 2-го типа, передавая активный TGF- β рецептору 1-го типа [31]. Передача пролиферативного стимула посредством TGF- β 1 определяется его последовательным связыванием с TGF- β R2, рекрутированием TGF- β R1 с образованием гетеромерного комплекса серин/треонинкиназы, который трансформирует TGF- β R1 и позволяет ему фосфорилировать Smad2 и Smad3, что приводит к их активации и димеризации со Smad4. В дальнейшем комплекс переносится в ядро, что вызывает последующую активацию специфических сайтов промоторных генов [32] (рис. 2).

В нормальных эпителиальных клетках TGF- β 1 активирует транскрипцию CDKN1A и CDKN2A, которые кодируют ингибиторы циклинзависимых киназ p21 и p15, вызывая остановку клеточного цикла в фазе G1 [33]. Потеря ингибирования роста и высокий уровень экспрессии TGF- β 1 связаны со злокачественной трансформацией и прогрессированием опухоли, в том числе РМЖ. Специфические мутации компонентов передачи сигналов TGF- β 1 при РМЖ встречаются редко [34]. Более вероятным является наличие изменений в профиле активности других сигнальных сетей или относительной доступности транскрипционных корепрессоров (коактиваторов), которые связываются с каноническим Smad-путем и модулируют его [35].

Помимо канонического пути TGF- β /Smad, TGF- β 1 может напрямую активировать сигнальные пути,

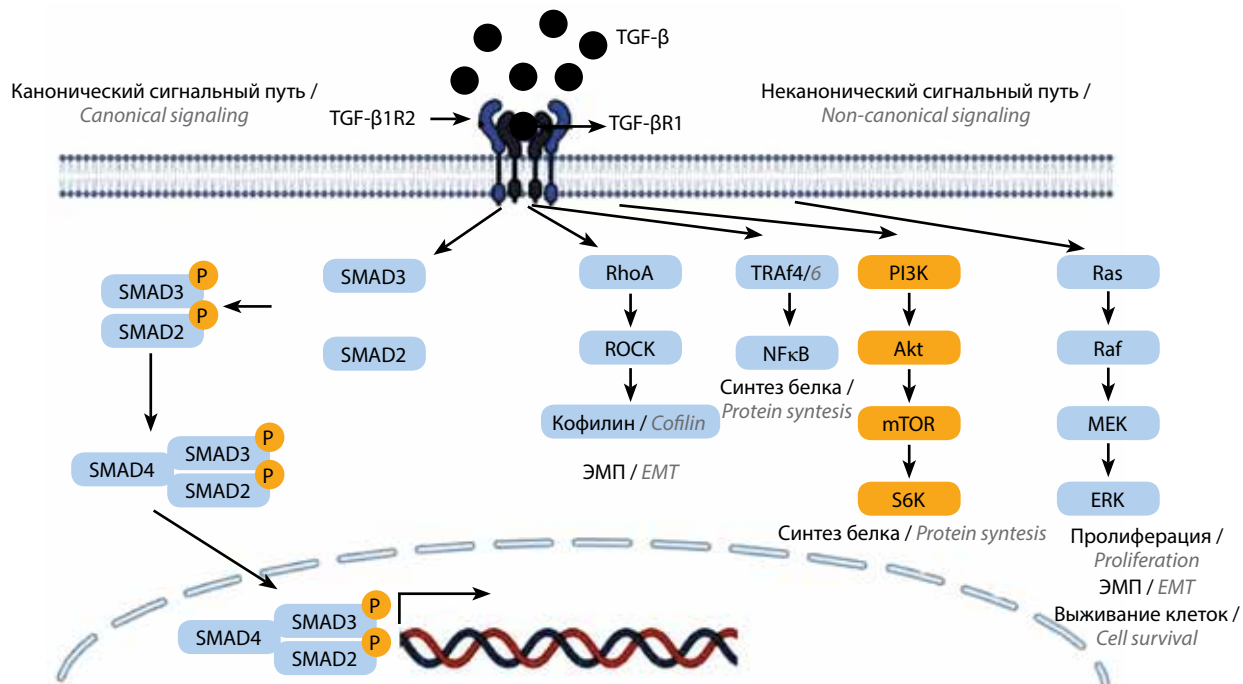


Рис. 2. Внутриклеточная сигнальная трансдукция трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) и его интеграция с PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/Akt (протеинкиназа B)/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) (рисунок создан с использованием Bio-Render.com). TGF- β 1R2 – рецептор трансформирующего фактора роста β 2; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
Fig. 2. Intracellular signal transduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and its integration with PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/Akt (protein kinase B)/mTOR (mammalian rapamycin target) (created with Bio-Render.com). TGF- β 1R2 – receptor of transforming growth factor β 2; EMT – epithelial-mesenchymal transition

отличные от Smad, включая MAPK. После образования рецепторного комплекса TGF β -R2/R1 происходит фосфорилирование ShcA по остаткам тирозина с последующей активацией Grb² и ГТФазы Ras [36, 37], определяющей фосфорилирование сопряженных белков киназы киназы MAPK, Raf, MEK и ERK. Результатом активации ERK является фосфорилирование факторов транскрипции, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки клеток молочной железы [38]. Кроме того, сами ГТФазы, такие как Ras, Rho, Rac и Cdc42, могут быть вовлечены в передачу TGF- β 1-сигналов, отличных от Smad [39] (см. рис. 2). Неканоническая активация RhoA ведет к фосфорилированию соответствующей киназы – Rho-киназы, которая участвует в процессах регуляции актинового цитоскелета, определяющего возможности миграции, необходимые для ЭМП, в том числе клеток РМЖ [40]. Показано, что RhoA опосредуют независимое от протеолиза амебное движение (округлое смещение с высокой скоростью миграции из-за отсутствия адгезии во внеклеточном матриксе), в то время как Rac1 и Cdc42 направляют клетки к мезенхимальному типу миграции (удлиненное смещение с низкой скоростью, связанное с адгезией и протеолитической деградацией внеклеточного матрикса) [41–43]. Кроме того, важным внутриклеточным путем, активация которого возможна посредством TGF- β 1, является TRAF6/TAK1/p38. Согласно данным исследований, рецепторы TGF- β индуцируют полиубиквитинирование K63 TRAF6, что способствует ассоциации между TRAF6 и TAK1 и последующей Smad-независимой активации JNK (с-Jun N-концевых киназ) и p38 [44].

СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ PI3K/АКТ/MTOR ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Комплексу PI3K/Akt/mTOR как сигнальному каскаду отведена главенствующая роль в регуляции основных клеточных процессов – метаболизма, клеточной пролиферации, апоптоза и ангиогенеза [45]. Фосфоинозитид-3-киназа является ферментом, связанным с плазматической мембраной. Ее активация опосредуется рецепторными тирозинкиназами и GPR30. Фосфоинозитид-3-киназы образуют 3 класса киназ, которые делятся на разные подклассы [46–48].

Подкласс IA-PI3K представлен гетеродимерами, состоящими из регуляторной (p85 α , p85 β , p85 γ) и каталитической (p110 α , p110 β , p110 δ , p110 γ) субъединиц. IA-PI3K присутствуют во многих типах тканей и активируются непосредственно рецепторами клеточной поверхности. Гетеродимерные белки подкласса IB-PI3K имеют регуляторную субъединицу p101, которая активирует каталитическую субъединицу p110 γ [49]. Выделяют 3 изоформы PI3Ks класса II: PI3K2 α (необходима для транслокации переносчика глюкозы GLUT4), PI3K2 β (экспрессирована в большинстве тканей и органов) и PI3K2 γ (экспрессирована только в печени, играет роль в инсулинзависимой передаче сиг-

налов, что необходимо для гомеостаза глюкозы) [50, 51]. К классу III PI3Ks причислен фермент VPS34, который вовлечен в регуляцию фагоцитоза, пиноцитоза, эндосомальной сортировки и аутофагии [52].

Активированный посредством лиганд-рецепторного взаимодействия PI3K катализирует фосфорилирование фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) по 3'-положению с образованием фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3), после чего происходит рекрутирование протеинкиназ Akt и PDK1 (фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа 1) на плазматическую мембрану через плекстрин-гомологичные домены. Далее Akt фосфорилируется с помощью mTORC2 по серину в положении 473 (Ser473), что изменяет конформацию Akt и делает возможным его последующее фосфорилирование PDK1 по треонину в положении 308 (Thr308). Активация Akt вызывает фосфорилирование многих нижестоящих мишеней в цитоплазме и ядре, что объясняет относительно широкий спектр его нижестоящих эффектов, включая клеточную пролиферацию, инвазию и ангиогенез [53].

Эффекты реализации PI3K/Akt/mTOR при РМЖ определяются функциональным состоянием как вышестоящих, так и нижестоящих компонентов пути. Экспериментальные исследования на клеточных линиях РМЖ, устойчивых к тамоксифену, продемонстрировали, что сверхэкспрессия HOXA5 ведет к активации PI3K/Akt/mTOR и последующему ингибированию экспрессии p53 и p21, необходимых для запуска апоптоза. Кроме того, показано, что HOXA5/Akt/p53 индуцирует развитие ЭМП [54]. Выявлена гиперэкспрессия MMPs, а также генов путей PI3K, MAPK и NF- κ B (транскрипционного ядерного фактора каппа В) в клеточных линиях MCF-7 при добавлении 50 мкМ тамоксифена, которая была ассоциирована с выраженными морфологическими изменениями, высокой скоростью роста и миграцией клеток, а также высоким адгезионным потенциалом. При этом повышение экспрессии генов *AKT1* и *MAPK1* фиксировали в клетках, обработанных 10 мкМ тамоксифена.

Валидация экспериментальных данных на клинических образцах показала ассоциацию высокого уровня экспрессии *MAPK1*, *AKT1*, *TIMP2*, *MMP1* и *MMP9* с неблагоприятным прогнозом и низкой выживаемостью пациентов с РМЖ, получавших тамоксифен [55]. Выявлено, что потеря гетерозиготности гена опухолевого супрессора *P TEN*, связанная со снижением или полной потерей экспрессии белка PTEN, приводит к аномальной активации пути PI3K/Akt с последующим приобретением резистентности к тамоксифену и рецидивам заболевания [56]. Также получены данные о корреляции молекулярных нарушений PI3K/Akt/mTOR с метаболическими нарушениями в опухолевых клетках линии MCF-7, обработанных тамоксифеном. Исследования показали повышение транскрипционной активности генов каскада PI3K/Akt, сопровождающееся подавлением активности *P TEN*

и *GSK-3β*, что связано с изменением скорости метаболизма глюкозы в клетках. Авторы отметили значительное увеличение скорости потребления глюкозы из культуральной среды в тамоксифен-резистентных клетках, ассоциированное с высоким уровнем экспрессии гена *GLUL* и незначительным изменением экспрессии гена *c-MYC*. Таким образом, молекулярные и метаболические изменения, предшествующие приобретенной резистентности к тамоксифену, могут быть использованы в качестве биомаркеров или мишеней чувствительности к нему [57].

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА β1 И ФОСФОИНОЗИТИД-3-КИНАЗА: ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ

В настоящее время накоплены данные о взаимосвязи сигнального пути TGF-β1 с каскадом PI3K/Akt/mTOR при РМЖ. Проведение внутриклеточного сигнала посредством 2 рассматриваемых путей сложно; их взаимная регуляция зависит от состояния клетки и связанных с ним патофизиологических процессов [58].

Доказана способность TGF-β1 быстро активировать PI3K, что подтверждается наличием фосфорилированного эффектора Akt, определяющего пролиферативную активность и эпителиально-мезенхимальную трансформацию опухолевых клеток молочной железы. Такие эффекты индукции PI3K выявлены как посредством участия TGF-β/TGF-βR, так и путем активации тромбоцитарного фактора роста (PDGF) [59, 60]. В экспериментах с введением экзогенного TGF-β обнаружено, что последний повышает активность PI3K за счет способности p85-ассоциированных иммунных комплексов фосфорилировать инозитиды *in vitro*. Результаты исследования свидетельствуют о потенциальной ассоциации как TGFβ-R1, так и TGFβ-R2 с регуляторной субъединицей p85 PI3K [61]. Для отдельных клеток (в частности, эндотелиальных) показана возможность TGF-β1-индуцированного ангиогенеза посредством аутокринной секреции TGF-α, фактора роста выживания клеток, активирующего PI3K/Akt и p42/p44 MAPK [62].

Однако существуют данные, указывающие на способность TGF-β1 подавлять сигнальную активность PI3K/Akt. Продемонстрировано, что активин/TGF-β-индуцированная экспрессия инозитолфосфатазы SHIP приводит к внутриклеточным изменениям в пуле фосфолипидов, а также к ингибированию фосфорилирования Akt и запуску апоптоза [63]. В свою очередь, Akt способен предотвращать фосфорилирование и ядерную транслокацию Smad3, что приводит к ингибированию TGF-β1-индуцированного апоптоза [64]. Представленные данные свидетельствуют о тесной регуляторной коммуникации TGF-β1 и PI3K/Akt при развитии опухолевого процесса во множестве точек взаимодействия.

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА β1 / ФОСФОИНОЗИТИД-3-КИНАЗА: ВКЛАД В РЕАЛИЗАЦИЮ ОТВЕТА НА ТАМОКСИФЕН

Результатом интеграции TGF-β1 и PI3K/Akt/mTOR может являться модуляция многочисленных эффектов, опосредованных данными сигнальными каскадами, в том числе активация пролиферативных процессов в клетках молочной железы (рис. 2). Обобщенные данные о непосредственном участии TGF-β1/PI3K в механизмах резистентности к антиэстрогенам, полученные в ходе исследований *in vitro* и *in vivo*, представлены в табл. 1.

Теоретическим основанием наличия тесной связи между TGF-β1 и Akt в тамоксифен-резистентных клетках стали экспериментальные данные о прямом регуляторном влиянии тамоксифена на индукцию TGF-β1 [65], а также об ингибировании антипролиферативных ответов TGF-β1 в присутствии Akt [61]. Для подтверждения данной гипотезы Y.A. Yoo и соавт. исследовали возможность прямой стимуляции пролиферации тамоксифен-резистентных линий опухолевых клеток молочной железы посредством TGF-β1. Авторы показали, что обработанные 4-ОНТ клетки, резистентные к тамоксифену, теряют способность к продукции TGF-β1 и фосфорилированию Smad3, а также избегают TGF-β1-опосредованного ингибирования роста [9]. Кроме того, ингибирование активности PI3K/Akt в тамоксифен-резистентных клетках путем трансфекции *Myc-Akt^{K179M}*, а также их обработка LY294002 (ингибитором PI3K) приводят к супрессии TGF-β1. Принудительная активация Akt путем трансфекции клеток MCF-7 вектором *Myc-Akt^{Myr}* подавляет ответ TGF-β1 посредством 4-ОНТ. Таким образом, были получены прямые доказательства супрессии TGF-β1 пролиферативных стимулов посредством активации Akt, что может быть связано с развитием устойчивости к тамоксифену в клетках РМЖ [9].

Подобная гиперактивация Akt может быть следствием наличия мутаций в гене *P TEN*, приводящих к отсутствию продукции белка [66]. В некоторых исследованиях представлены и другие возможные механизмы активации Akt. Так, EGF и TGF-α демонстрируют способность к активации Akt в тамоксифен-резистентных линиях клеток молочной железы по сравнению с линией MCF-7, что предполагает наличие аутокринной или паракринной активации Akt через гетеродимерный комплекс EGFR/HER2 [67].

Наш опыт исследования Akt как ключевой мишени, связывающей многочисленные сигнальные пути при РМЖ, показал высокий уровень экспрессии фосфорилированной формы белка Akt (pS473) у больных с отсутствием ответа на тамоксифен [68]. С учетом представленных выше данных о непосредственном вовлечении TGF-β1/PI3K в механизмы устойчивости к тамоксифену можно предположить маркерную значимость белков-эффекторов этих каскадов. Мы инициировали такое исследование и получили предварительные результаты,

Таблица 1. Обобщенные данные о непосредственном участии сигнальных каскадов трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) и фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) в механизмах резистентности к антиэстрогенам, полученные в ходе исследований *in vitro* и *in vivo*

Table 1. Summarized data on direct involvement of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling cascades in mechanisms of resistance against antiestrogens obtained in *in vitro* and *in vivo* experiments

| Объект исследования/мишень Test subject/target | Результаты исследования/механизм действия Study results/mechanism of action | Источник Source |
|--|---|-------------------------------------|
| TGF- $\beta 1$ | Тамоксифен индуцирует экспрессию TGF- $\beta 1$ в линии клеток MCF-7 Tamoxifen induces TGF- $\beta 1$ expression in MCF-7 cell line | [65] |
| PI3K | TGF- $\beta 1R1$ и TGF- $\beta 2R2$ опосредованно взаимодействуют с p85 PI3K. Оба типа рецепторов необходимы для лиганд-индуцированной активации PI3K. Активация TGF β -R1 индуцирует активность PI3K в эпителиальных клетках TGF- $\beta 1R1$ and TGF- $\beta 2R2$ indirectly interact with p85 PI3K. Both receptor types are necessary for ligand-induced PI3K activation. TGF β -R1 activation induces PI3K activity in epithelial cells | [61] |
| Akt | Ингибирование активности PI3K/Akt в резистентных к тамоксифену клеточных линиях приводит к супрессии TGF- $\beta 1$. Эпидермальный фактор роста (EGF) и TGF- α активируют Akt в резистентных к тамоксифену линиях клеток молочной железы посредством аутокринной или паракринной регуляции. Высокий уровень экспрессии Akt (pS473) связан с неэффективным ответом на тамоксифен у больных раком молочной железы. Наблюдается подавление роста тамоксифен- и фулвестрант-резистентных клеточных линий при добавлении в среду ингибиторов PI3K или Akt. Обработка летрозол- или фулвестрант-резистентных клеток ингибитором mTOR восстанавливает антиэстрогенную активность Inhibition of PI3K/Akt activity in tamoxifen-resistant cell lines leads to TGF- $\beta 1$ suppression. Epidermal growth factor (EGF) and TGF- α activate Akt in tamoxifen-resistant breast cancer cell lines through autocrine or paracrine regulation. High Akt (pS473) expression level is associated with ineffective response to tamoxifen in patients with breast cancer. Addition of PI3K or Akt inhibitors to culture medium leads to suppression of growth of tamoxifen- and fulvestrant-resistant cell lines. Treatment of letrozole- or fulvestrant-resistant cell lines with mTOR inhibitor restores antiestrogen activity | [9] [67] [68] [69] [70] |
| pAkt ⁺ / TGF- $\beta 2R2$ ⁻ | Субпопуляция клеток pAkt ⁺ /TGF- $\beta 2R2$ ⁻ преобладает у пациентов тамоксифен-резистентной группы pAkt ⁺ /TGF- $\beta 2R2$ ⁻ cell subpopulation is prevalent in patients of tamoxifen-resistant group | [71] |

Примечание. TGF- $\beta 1R1$ – рецептор 1 TGF- β ; TGF- $\beta 2R2$ – рецептор 2 TGF- β ; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; Akt – протеинкиназа B.

Note. TGF- $\beta 1R1$ – TGF- β receptor 1; TGF- $\beta 2R2$ – TGF- β receptor 2; mTOR – mammalian rapamycin target; Akt – protein kinase B.

свидетельствующие о потенциальном вкладе pAkt⁺/TGF- $\beta 2R2$ -популяции опухолевых клеток в формирование резистентного к тамоксифену фенотипа [71].

Интересно, что формирование резистентности к фулвестранту – конкурентному антагонисту эстрогеновых рецепторов – в большей степени связано с изменением активности PI3K/Akt/mTOR. Экспериментальные исследования продемонстрировали подавление роста антиэстроген-резистентных клеточных линий (резистентных как к тамоксифену, так и к фулвестранту) при добавлении в среду ингибиторов PI3K или Akt [69]. Кроме того, на модели *in vitro* показана возможность преодоления резистентности к летрозолу или фулвестранту при одновременном ингибировании сразу двух мишеней: ER α и mTOR [70]. Сравнительный детальный анализ профиля экспрессии генов и метилирования ДНК тамоксифен- и фулвестрант-резистентных клеточных линий выявил их специфические молекулярные особенности. Так, устойчивость к тамоксифену была ассоциирована с активацией ER α -опосредованных регуляторных механизмов, тогда как резистентность к фулвестранту связана с аутокринно-регулируемой пролиферацией посредством

активации сигнальных путей независимо от ER α . Авторы полагают, что в механизмы резистентности к данным препаратам вовлечены принципиально разные сигнальные каскады [72].

ИНГИБИТОРЫ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА $\beta 1$ И ФОСФОИНОЗИТИД-3-КИНАЗЫ КАК СПОСОБ ПРЕОДОЛЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Накопленные экспериментальные данные позволили рассматривать TGF- $\beta 1$ в качестве перспективной терапевтической мишени при многих злокачественных новообразованиях. В настоящее время разработаны различные стратегии блокирования пролиферативных стимулов TGF- $\beta 1$, в том числе с использованием моноклональных антител, направленных на лиганд и рецепторы TGF- $\beta 1$, а также бифункциональные молекулы TGF- $\beta 1$ /PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1), антисмысловые олигонуклеотиды, TGF- $\beta 1$ -ассоциированные вакцины и ингибиторы рецепторных киназ (табл. 2). Однако плейотропное действие TGF- $\beta 1$ в механизмах

клеточного и тканевого гомеостаза остается основным существенным ограничением быстрой клинической разработки анти-TGF- β 1-агентов.

Иницированы клинические исследования фазы I (NCT03524170), направленные на оценку побочных эффектов и определение оптимальной дозы бинтрафуса альфа (M7824) – бифункционального препарата, включающего моноклональные антитела против PD-L1, интегрированные с внеклеточным доменом двух молекул TGF- β 2, – при его назначении в комбинации с лучевой терапией у пациентов с распространенным гормонположительным РМЖ без амплификации HER2 [73].

Продолжаются клинические исследования фазы II (NCT01401062) по изучению безопасности и эффективности фрезолиумаба (GC1008, панспецифическое рекомбинантное моноклональное антитело против трех изоформ TGF- β) в сочетании с лучевой терапией у пациентов с метастатическим РМЖ. Показано, что больные, получавшие более высокую дозу этого препарата, имели благоприятный системный иммунный ответ и более длительную медиану общей выживаемости, чем больные, которым назначена более низкая его доза [74].

Фармакокинетические характеристики вактосертиба – ингибитора TGF- β 1 – были оценены в рамках многоцентрового клинического исследования I фазы у пациентов с распространенным РМЖ. Данные, полученные в ходе этого эксперимента, будут чрезвычайно востребованы для последующей клинической разработки препарата [75].

В отличие от TGF- β 1 фундаментальная значимость сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в процессах пролиферации, метаболизма опухолевых клеток и формирования гормональной резистентности фактически предопределила развитие стратегий, направленных на фармакологическое блокирование основных его компонентов.

Ингибиторы PI3K 1-го поколения, также известные как пан-PI3K-ингибиторы, нацелены на все 4 каталитические изоформы PI3K класса I. Клинические исследования BELLE-2 (NCT01610284) и BELLE-3 (NCT01633060) перорального пан-PI3K-ингибитора бупарлисиба (BKM120) в комбинации с фулвестрантом продемонстрировали его эффективность у больных распространенным гормонположительным РМЖ без амплификации HER2. Однако выраженная токсичность комбинации препаратов привела к прекращению исследований [76, 77]. Изучение эффективности подобного пан-PI3K-ингибитора пиктилисиба (GDC-094) в сочетании с фулвестрантом у пациенток в постменопаузе с метастатическим гормонположительным РМЖ, резистентным к ингибиторам ароматазы, не продемонстрировало выраженного преимущества по показателям выживаемости без прогрессирования. Высокая токсичность этого препарата была сопоставима с токсичностью бупарлисиба [78].

Селективные ингибиторы изоформ PI3K должны были повысить эффективность и одновременно снизить токсичность таргетных препаратов. Применение таселисиба (GDC-0032) – α -специфичного ингибитора PI3K – продемонстрировало выраженный эффект подавления опухоли на моделях ксенотрансплантатов. В комбинации с фулвестрантом этот препарат показал лучшие результаты, чем при его использовании в качестве монотерапии, у пациенток в постменопаузе с метастатическим РМЖ с мутацией в *PIK3CA* и прогрессированием во время/после гормональной терапии [79]. Однако дальнейшие исследования таселисиба были остановлены из-за высокой частоты нежелательных явлений.

Апелелисиб (pique™; BYL719) стал первым высокоселективным ингибитором α -изоформы PI3K. Он был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) США в мае 2019 г. и рекомендован к применению в сочетании с фулвестрантом для лечения пациенток в постменопаузе с гормонположительным HER2-отрицательным распространенным или метастатическим РМЖ с мутацией в гене *PIK3CA*, резистентным к гормональной терапии [80]. Исследование SOLAR-1 (NCT02437318) показало, что у больных, получавших апелелисиб в комбинации с фулвестрантом, выживаемость без прогрессирования была значительно выше, чем у больных, принимавших плацебо и фулвестрант (11 мес против 5,7 мес) [81]. Применение апелелисиба или бупарлисиба с тамоксифеном и гозерелином в качестве терапии 1-й линии продемонстрировало обнадеживающие результаты у пациенток азиатской популяции с РМЖ в пременопаузе [82].

На основании доклинических исследований, которые доказали синергизм ингибиторов CDK4/6 и ингибиторов PI3K, проводятся клинические исследования инаволисиба (GDC-0077) – ингибитора p110a – в качестве монотерапии или в комбинации с летрозолом/фулвестрантом и палбоциклибом для лечения местно-распространенного или метастатического *PIK3CA*-мутантного РМЖ [83].

Потенциальный эффект ингибиторов Akt изучен в исследованиях, проведенных в основном с участием больных метастатическим гормонположительным HER2-отрицательным РМЖ. Пан-Akt-ингибитор капивасертиб в сочетании с фулвестрантом (исследование ФАКТИОН) продемонстрировал высокие показатели выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости при распространенном РМЖ, резистентном к ингибиторам ароматазы [84]. Клинический опыт применения ингибиторов Akt на ранних стадиях гормонположительного РМЖ остается довольно редким. В клиническом исследовании II фазы неoadъювантная терапия аллостерическим Akt-ингибитором МК-2206 в сочетании с анастрозолом не обеспечила полного патоморфологического ответа у пациенток с РМЖ ранних стадий с мутацией в *PIK3CA*, что привело к прекращению изучения препаратов [85].

Таблица 2. Клинические исследования ингибиторов сигнальных путей трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) и фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) при гормонположительном раке молочной железы

Table 2. Clinical trials of transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling inhibitors in hormone-positive breast cancer

| Препарат Drug | Мишень Target | Механизм действия Mechanism of action | Дизайн Design | Исследование Trial | Результаты, источник Results, source |
|--|---|---|--|---|--|
| Бинтрафусп альфа (M7824) Bintrafusp alpha (M7824) | TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$ | Моноклональное антитело против PD-L1, связанное с внеклеточным доменом TGF- β R2, блокирует 3 изоформы TGF- β Monoclonal antibody against PD-L1 linked to TGF- β R2 extracellular domain, blocks 3 forms of TGF- β | Лучевая терапия + бинтрафусп альфа Radiotherapy + bintrafusp alpha | NCT03524170, фаза I NCT03524170, phase I | Не закончено [73] Not completed [73] |
| Фрезолиму- маб (GC1008) Fresolimumab (GC1008) | TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$ | Панспецифическое рекомбинантное моноклональное антитело, блокирует 3 изоформы TGF- β Panspecific recombinant monoclonal antibody, blocks 3 isoforms of TGF- β | Лучевая терапия + фрезолимумаб Radiotherapy + fresolimumab | NCT01401062, фаза II NCT01401062, phase II | Благоприятный системный иммунный ответ, длительная медиана общей выживаемости в группе пациентов, получавших высокую дозу фрезолимумаба, по сравнению с группой, получавшей более низкую дозу этого препарата [74] Favorable systemic immune response, long median overall survival in the group of patients receiving high fresolimumab dose compared to the group of patients receiving lower dose of the drug [74] |
| Вактосертиб Vactosertib | TGF- β R1 | Блокирует TGF- β R1 Blocks TGF- β R1 | Вактосертиб + монотерапия Vactosertib + monotherapy | Фаза I Phase I | Проведен анализ фармакокинетики препарата [75] Analysis of drug pharmacokinetics was performed [75] |
| Бупарлисиб (ВКМ120) Buparlisib (ВКМ120) | PI3K α , PI3K β , PI3K γ , PI3K δ | Блокирует 4 изоформы PI3K Blocks 4 isoforms of PI3K | Бупарлисиб + фулвестрант, плацебо + фулвестрант Buparlisib + fulvestrant, placebo + fulvestrant | NCT01610284 (BELLE-2), NCT01633060 (BELLE-3) | Увеличение выживаемости без прогрессирования в группе пациентов, получавших бупарлисиб + фулвестрант; выраженная токсичность комбинации препаратов [76, 77] Increased progression-free survival in the group of patients receiving buparlisib plus fulvestrant; marked toxicity of the drug combination [76, 77] |
| Пиктилисиб (GDC-094) Pictilisib (GDC-094) | PI3K α , PI3K β , PI3K γ , PI3K δ | Блокирует 4 изоформы PI3K Blocks 4 isoforms of PI3K | Пиктилисиб + фулвестрант, плацебо + фулвестрант Pictilisib + fulvestrant, placebo + fulvestrant | FERGI, фаза II FERGI, phase II | Не получено значимых различий по показателям выживаемости без прогрессирования в группе пациентов, получавших пиктилисиб + фулвестрант; выраженная токсичность [78] No significant differences in progression-free survival in the group of patients receiving pictilisib + fulvestrant; marked toxicity [78] |
| Таселисиб (GDC-0032) Taselisib (GDC-0032) | PI3K α | Блокирует α -каталитическую изоформу PI3K Blocks α -catalytic isoform of PI3K | Таселисиб + фулвестрант, плацебо + фулвестрант Taselisib + fulvestrant, placebo + fulvestrant | NCT02340221 (SANDPIPER), фаза III NCT02340221 (SANDPIPER), phase III | Увеличение показателей выживаемости без прогрессирования в группе пациентов, получавших таселисиб + фулвестрант [79] Increased progression-free survival in the group of patients receiving taselisib + fulvestrant [79] |

Окончание табл. 2
The end of table 2

| Препарат Drug | Мишень Target | Механизм действия Mechanism of action | Дизайн Design | Исследование Trial | Результаты, источник Results, source |
|--|---|---|---|---|--|
| Апеллисиб (BYL719) Aplisib (BYL719) | P13K α | Блокирует α -каталитическую изоформу P13K Blocks α -catalytic isoform of P13K | Апеллисиб + фулвестрант, плаце- бо + фулвестрант Aplisib + fulvestrant, placebo + fulvestrant | NCT02437318 (SOLAR-1), фаза III NCT02437318 (SOLAR-1), phase III | Увеличение показателей выживаемости без прогресси- рования в группе пациентов, получавших апеллисиб + фулвестрант [81] Increased progression-free survival in the group of patients receiving aplisib + fulvestrant [81] |
| Апеллисиб (BYL719). Aplisib (BYL719). Бупарлисиб (VKM120) Buparlisib (VKM120) | P13K α , P13K β , P13K γ , P13K δ | Блокирует α -каталитическую изоформу P13K. Blocks α -catalytic isoform of P13K. Блокирует 4 изоформы P13K Blocks 4 isoforms of P13K | Апеллисиб, тамоксифен + гозерелин. Aplisib, tamoxifen + goserelin. Бупарлисиб, тамок- сифен + гозерелин Buparlisib, tamoxifen + goserelin | NCT02058381, фаза Ib NCT02058381, phase Ib | Рекомендованная доза апеллисиба и бупарлисиба составила 350 и 100 мг соответственно [82] Recommended doses of apelisib and buparlisib amounted to 350 and 100 mg, respectively [82] |
| Инаволисиб (GDC-0077) Inavolisib (GDC-0077) | P13K α | Блокирует α -каталитическую изоформу P13K Blocks α -catalytic isoform of P13K | Инаволисиб + монотерапия, инаволисиб + антиэстрогены Inavolisib + monotherapy, inavolisib + antiestrogens | NCT03006172, фаза I NCT03006172, phase I | Не закончено [83] Not completed [83] |
| Капивасер- тиб (AZD5363) Capivasertib (AZD5363) | Akt1, Akt2, Akt3 | Блокирует 3 изоформы Akt Blocks 3 isoforms of Akt | Капивасертиб + фулвестрант, плаце- бо + фулвестрант Capivasertib + fulvestrant, placebo + fulvestrant | NCT01992952 (ФАКТIОН), фаза II NCT01992952 (FAKTION), phase II | Увеличение показателей выживаемости без прогресси- рования в группе пациентов, получавших капивасертиб + фулвестрант [84] Increased progression-free survival in the group of patients receiving capivasertib + fulvestrant [84] |
| МК-2206 | Akt1, Akt2, Akt3 | Блокирует 3 изоформы Akt Blocks 3 isoforms of Akt | МК-2206 + анастрозол MK-2206 + anastrozole | Фаза II Phase II | Отсутствие полного патоморфологического ответа [85] Absence of complete pathomorphological response [85] |

Примечание. TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1; TGF- β 2 – трансформирующий фактор роста β 2; TGF- β 3 – трансформирующий фактор роста β 3; TGF- β R1 – рецептор 1 трансформирующего фактора роста β ; TGF- β R2 – рецептор 2 трансформирующего фактора роста β ; P13K β – фосфоинозитид-3-киназа β ; P13K γ – фосфоинозитид-3-киназа γ ; P13K δ – фосфоинозитид-3-киназа δ ; PD-L1 – лиганд рецептора проаграммируемой клеточной гибели 1.

Note. TGF- β 1 – transforming growth factor β 1; TGF- β 2 – transforming growth factor β 2; TGF- β 3 – transforming growth factor β 3; TGF- β R1 – receptor 1 transforming growth factor β ; TGF- β R2 – receptor 2 transforming growth factor β ; P13K β – phosphoinositide-3-kinase β ; P13K γ – phosphoinositide-3-kinase γ ; P13K δ – phosphoinositide-3-kinase δ ; PD-L1 – programmed cell death 1 ligand 1.

Таким образом, целенаправленное воздействие на ключевые эффекторы TGF- β 1/PI3K представляет перспективную стратегию преодоления устойчивости к гормональной терапии, в том числе к тамоксифену. Однако выбор ключевой, основной мишени весьма затруднителен, поскольку, с одной стороны, применение пан-ингибиторов (PI3K, Akt) сопряжено с высоким профилем их токсичности, а с другой, использование отдельных ключевых эффекторов TGF- β 1/PI3K может способствовать запуску альтернативных сигнальных путей, обеспечивающих рост опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказанная эффективность и низкая частота побочных эффектов тамоксифена обуславливают его

успешное применение у пациенток с гормонположительным РМЖ. Формирование непосредственной или приобретенной резистентности к тамоксифену диктует необходимость изучения механизмов нереализованного клинического ответа. Экспериментальные исследования подтверждают активацию TGF- β 1/PI3K-опосредованной трансдукции, обеспечивающую способность опухолевых клеток молочной железы к лекарственной устойчивости. Накопленные к настоящему времени знания позволяют рассматривать сигнальный путь TGF- β 1/PI3K как потенциальный молекулярный инструмент для поиска эффективных стратегий блокирования резистентности опухолевых клеток к тамоксифену.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадной. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2022. 252 с. Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: FSBI "MNIIOI named after P.A. Herzen" of the Ministry of Health of Russia, 2022. 252 p. (In Russ.).
2. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020. *Int J Cancer* 2021;10:778–89. DOI: 10.1002/ijc.33588
3. Burstein H.J., Curigliano G., Thürlimann B. et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol* 2021;32(10):1216–35. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.06.023
4. Jordan V.C. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Curr Probl Cancer* 1992;16(3):129–76. DOI: 10.1016/0147-0272(92)90002-6
5. Zarzynska J.M. Two faces of TGF- β 1 in breast cancer. *Mediators Inflamm* 2014;2014:141747. DOI: 10.1155/2014/141747
6. Silberstein G.B., Daniel C.W. Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor- β . *Science* 1987;237(4812):291–3. DOI: 10.1126/science.3474783
7. Knabbe C., Lippman M.E., Wakefield L.M., et al. Evidence that transforming growth factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987;48(3):417–28. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90193-0
8. Lamouille S., Derynck R. Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 2007;178(3):437–51. DOI: 10.1083/jcb.200611146
9. Yoo Y.A., Kim Y.H., Kim J.S. et al. The functional implications of Akt activity and TGF- β signaling in tamoxifen-resistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(3):438–47. DOI: 10.1016/j.bbamer.2007.12.001
10. Nardone A., De Angelis C., Trivedi M.V., et al. The changing role of ER in endocrine resistance. *Breast* 2015;24(2):60–6. DOI: 10.1016/j.breast.2015.07.015
11. Fuentes N., Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2019;116:135–70. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.00
12. Dahlman-Wright K., Cavaillès V., Fuqua S.A. et al. International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58(4):773–81. DOI: 10.1124/pr.58.4.8
13. O'Lone R., Frith M.C., Karlsson E.K. et al. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004;18(8):1859–75. DOI: 10.1210/me.2003-0044
14. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2000;29(14):2905–19. DOI: 10.1093/nar/29.14.2905
15. Filardo E.J., Quinn J.A., Bland K.I. et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 2000;14(10):1649–60. DOI: 10.1210/mend.14.10.0532
16. Filardo E.J., Quinn J.A., Frackelton A.R. et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16(1):70–84. DOI: 10.1210/mend.16.1.0758
17. Koszegi Z., Cheong R.Y. Targeting the non-classical estrogen pathway in neurodegenerative diseases and brain injury disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:999236. DOI: 10.3389/fendo.2022.999236
18. Prossnitz E.R., Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(12):715–26. DOI: 10.1038/nrendo.2011.122
19. Ali S., Rasool M., Chaoudhry H. et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformatics* 2016;12(3):135–9. DOI: 10.6026/97320630012135
20. Hörlein A.J., Näär A.M., Heinzel T. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995;377(6548):397–404. DOI: 10.1038/377397a0
21. Heldring N., Pawson T., McDonnell D. et al. Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J Biol Chem* 2007;282(14):10449–55. DOI: 10.1074/jbc.M611424200
22. De Amicis F., Zupo S., Panno M.L. et al. Progesterone receptor B recruits a repressor complex to a half-PRE site of the estrogen receptor alpha gene promoter. *Mol Endocrinol* 2009;23(4):454–65. DOI: 10.1210/me.2008-0267

23. Bartella V., Rizza P., Barone I. et al. Estrogen receptor beta binds Sp1 and recruits a corepressor complex to the estrogen receptor alpha gene promoter. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134(2):569–81. DOI: 10.1007/s10549-012-2090-9
24. Hurtado A., Holmes K.A., Geistlinger T.R. et al. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 2008;456(7222):663–6. DOI: 10.1038/nature07483
25. Syed V. TGF- β signaling in cancer. *J Cell Biochem* 2016;117(6):1279–87. DOI: 10.1038/nature07483
26. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597–641. DOI: 10.1146/annurev.cb.06.110190.003121
27. Gentry L.E., Lioubin M.N., Purchio A.F. et al. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 1988;8(10):4162–8. DOI: 10.1128/mcb.8.10.4162 – 4168
28. Piek E., Heldin C.H., Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999;13(15):2105–24.
29. Papageorgis P. TGF β signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. *J Oncol* 2015;2015:587193. DOI: 10.1155/2015/587193
30. Lin H.Y., Wang X.F. Expression cloning of TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* 1992;32(2):105–10. DOI: 10.1002/mrd.1080320205.
31. Massagué J. A very private TGF-beta receptor embrace. *Mol Cell* 2008;29(2):149–50. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.01.006
32. Tzavlaki K., Moustakas A. TGF- β signaling. *Biomolecules* 2020;10(3):487. DOI: 10.3390/biom10030487
33. Denicourt C., Dowdy S.F. Another twist in the transforming growth factor beta-induced cell-cycle arrest chronicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(26):15290–301. DOI: 10.1073/pnas.0307282100
34. Babyskhina N., Malinovskaya E., Stakheyeva M. et al. Association of functional -509c>t polymorphism in the TGF- β 1 gene with infiltrating ductal breast carcinoma risk in a Russian western Siberian population. *Cancer Epidemiol* 2011;35(6):560–63. DOI: 10.1016/j.canep.2011.02.002
35. Barcellos-Hoff M.H., Akhurst R.J. Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late. *Breast Cancer Res* 2009;11(1):202–7. DOI: 10.1186/bcr2224
36. Lee M.K., Pardoux C., Hall M.C. et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 2007;26(17):3957–67. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601818
37. McKay M.M., Morrison D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26(22):3113–22. DOI: 10.1038/sj.onc.1210394
38. van der Geer P., Hunter T., Lindberg R.A. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:251–337. DOI: 10.1146/annurev.cb.10.110194.001343
39. Zhang Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009;19(1):128–39. DOI: 10.1038/cr.2008.328
40. Kim S., Kim S.A., Han J., et al. Rho-Kinase as a target for cancer therapy and its immunotherapeutic potential. *Int J Mol Sci* 2021;22(23):12916–36. DOI: 10.3390/ijms222312916
41. Sahai E., Marshall C.J. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(2):133–42. DOI: 10.1038/nrc725
42. Panková K., Rösel D., Novotný M. et al. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(1):63–71. DOI: 10.1007/s00018-009-0132-1
43. Taddei M.L., Giannoni E., Morandi A. et al. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun Signal* 2014;12:24–35. DOI: 10.1186/1478-811X-12-24
44. Yamashita M., Fatyol K., Jin C. et al. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 2008;31(6):918–24. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.09.002
45. Paplomata E., O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol* 2014;6(4):154–66. DOI: 10.1177/1758834014530023
46. Backer J.M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 2008;410(1):1–17. DOI: 10.1042/BJ20071427
47. Vadas O., Burke J.E., Zhang X. et al. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal* 2011;4(195):re2. DOI: 10.1126/scisignal.2002165
48. Brown J.R., Auger K.R. Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evol Biol* 2011;11:4–17. DOI: 10.1186/1471-2148-11-4
49. Yu X., Long Y.C., Shen H.M. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy* 2015;11(10):1711–28. DOI: 10.1080/15548627.2015.1043076
50. Falasca M., Hughes W.E., Dominguez V. et al. The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J Biol Chem* 2007;282(38):28226–36. DOI: 10.1074/jbc.M704357200
51. Braccini L., Ciraolo E., Campa C.C. et al. PI3K-C2 γ is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nat Commun* 2015;6:7400–15. DOI: 10.1038/ncomms8400
52. Backer J.M. The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. *Biochem J* 2016;473(15):2251–71. PMID: 35295334. DOI: 10.3389/fphar.2022.791272
53. Hinz N., Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):154–82. DOI: 10.1186/s12964-019-0450-3
54. Kim C.Y., Kim Y.C., Oh J.H. et al. HOXA5 confers tamoxifen resistance via the PI3K/AKT signaling pathway in ER-positive breast cancer. *J Cancer* 2021;12(15):4626–37. DOI: 10.7150/jca.59740
55. Hamadneh L., Bahader M., Abuarqoub R. et al. PI3K/AKT and MAPK1 molecular changes preceding matrix metalloproteinases overexpression during tamoxifen-resistance development are correlated to poor prognosis in breast cancer patients. *Breast Cancer* 2021;28(6):1358–66. DOI: 10.1007/s12282-021-01277-2
56. Tanic N., Milovanovic Z., Tanic N. et al. The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2012;13(12):1165–74. DOI: 10.4161/cbt.21346
57. Hamadneh L., Abuarqoub R., Alhusban A. et al. Upregulation of PI3K/AKT/PTEN pathway is correlated with glucose and glutamine metabolic dysfunction during tamoxifen resistance development in MCF-7 cells. *Sci Rep* 2020;10:21933–40. DOI: 10.1038/s41598-020-78833-x
58. Baba A.B., Rah B., Bhat G.R. et al. Transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling in cancer-A betrayal within. *Front Pharmacol* 2022;13:791272–87. DOI: 10.3389/fphar.2022.791272
59. Bakin A.V., Tomlinson A.K., Bhowmick N.A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000;275(47):36803–10. DOI: 10.1074/jbc.M005912200
60. Jechlinger M., Sommer A., Moriggl R. et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 2006;116(6):1561–70. DOI: 10.1172/JCI24652
61. Yi J.Y., Shin I., Arteaga C.L. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2005;280(11):10870–76. DOI: 10.1074/jbc.M413223200
62. Viñals F., Pouyssegur J. Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol* 2001;21(21):7218–30. DOI: 10.1128/MCB.21.21.7218-7230.2001

63. Valderrama-Carvajal H., Cocolakis E., Lacerte A. et al. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 2002;4(12):963–9. DOI: 10.1038/ncb885
64. Conery A.R., Cao Y., Thompson E.A. et al. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 2004;6(4):366–72. DOI: 10.1038/ncb1117
65. Perry R.R., Kang Y., Greaves B.R. Relationship between tamoxifen induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 1995;72(6):1441–6. DOI: 10.1038/bjc.1995.527
66. Fry M.J. Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res* 2001;3(5):304–12. DOI: 10.1186/bcr312
67. Jordan N.J., Gee J.M., Barrow D. et al. Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87(2):167–80. DOI: 10.1023/B:BREA.0000041623.21338.47
68. Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Завьялова М.В. и др. Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/Akt-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):40–50. DOI: 17650/2313-805X-2018-5-3-40-50
- Dronova T.A., Babushkina N.N., Zavyalova M.V. et al. Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer. *Uspëhi Molekulârnoy Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):40–50. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-40-50
69. Frogne T., Jepsen J.S., Larsen S.S. et al. Antiestrogen-resistant human breast cancer cells require activated protein kinase B/Akt for growth. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(3):599–614. DOI: 10.1677/erc.1.00946
70. Beeram M., Tan Q.T., Tekmal R.R. et al. Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Ann Oncol* 2007;18(8):1323–8. DOI: 10.1093/annonc/mdm170
71. Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Слонимская Е.М. и др. Рецептор трансформирующего фактора роста II типа (TGFβR2) и pAKT: связь с формированием резистентного к гормонотерапии фенотипа эстроген-позитивных опухолей молочной железы. В кн.: VII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2021». Материалы VII Петербургского международного онкологического форума. Санкт-Петербург, 2021. С. 255.
- Dronova T.A., Babushkina N.N., Slonimskaya E.M. et al. Transforming growth factor receptor type II (TGFβR2) and pAKT: association with hormone-resistant phenotype in estrogen receptor-positive breast cancer. V knige: VII Peterburgskij mezhdunarodnyj onkologicheskij forum «Belye Nochi 2021». Materialy VII Peterburgskogo mezhdunarodnogo onkologicheskogo foruma. Sankt-Peterburg. In: VII St. Petersburg International Oncology Forum “White Nights 2021”. Materials of the VII St. Petersburg International Oncology Forum. Saint Petersburg, 2021. P. 255. (In Russ.).
72. Fan M., Yan P.S., Hartman-Frey C. et al. Diverse gene expression and DNA methylation profiles correlate with differential adaptation of breast cancer cells to the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant. *Cancer Res* 2006;66(24):11954–66. DOI: 10.1158/0008-5472
73. Radiation therapy and M7824 in treating patients with metastatic hormone receptor positive, HER2 negative breast cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03524170>.
74. Formenti S.C., Lee P., Adams S. et al. Focal irradiation and systemic TGFβ blockade in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2018;24(11):2493–2504. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3322
75. Jung S.Y., Yug J.S., Clarke J.M. et al. Population pharmacokinetics of vactosertib, a new TGF-β receptor type I inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2020;85(1):173–83. DOI: 10.1007/s00280-019-03979-z
76. Baselga J., Im S.A., Iwata H. et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(7):904–16. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30376-5
77. Di Leo A., Johnston S., Lee K.S. et al. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018;19(1):87–100. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30688-5
78. Krop I.E., Mayer I.A., Ganju V. et al. Pictilisib for oestrogen receptor-positive, aromatase inhibitor-resistant, advanced or metastatic breast cancer (FERG1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(6):811–21. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)00106-6
79. Baselga J., Dent S.F. Phase III study of taseolisib (GDC-0032) + fulvestrant (FULV) v FULV in patients (pts) with estrogen receptor (ER)-positive, PIK3CA-mutant (MUT), locally advanced or metastatic breast cancer (MBC): primary analysis from SANDPIPER. *J Clin Oncol* 2018;36(Suppl. 18):LBA1006. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.18_suppl.LBA1006
80. Markham A. Alpelisib: first global approval. *Drugs* 2019;79(11):1249–53. DOI: 10.1007/s40265-019-01161-6
81. André F., Ciruelos E., Rubovszky G. et al. SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2019;380(20):1929–40. DOI: 10.1056/NEJMoa1813904
82. Lu Y.S., Lee K.S., Chao T.Y. et al. A Phase Ib study of alpelisib or buparlisib combined with tamoxifen plus goserelin in premenopausal women with HR-positive HER2-negative advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2021;27(2):408–17. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1008
83. ClinicalTrials.gov. to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of inavolisib single agent in participants with solid tumors and in combination with endocrine and targeted therapies in participants with breast cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03006172>
84. Jones R.H., Casbard A., Carucci M. et al. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(3):345–57. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30817-4
85. Ma C.X., Suman V., Goetz M.P. et al. A Phase II trial of neoadjuvant MK-2206, an AKT Inhibitor, with anastrozole in clinical stage II or III PIK3CA-mutant ER-positive and HER2-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(22):6823–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1260

Вклад авторов

Н.Н. Бабышкина: написание текста статьи, редактирование;
И.А. Узьянбаев, Т.А. Дронова: поиск и обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи;
Н.В. Чердынцева: редактирование.

Authors' contribution

N.N. Babyshkina: article writing, editing;
I.A. Uzyanbaev, T.A. Dronova: search and review of literature on the topic of the article, article writing;
N.V. Cherdyntseva: editing.

ORCID авторов / ORCID authors

Н.Н. Бабышкина / N.N. Babyshkina: <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>;
Т.А. Дронова / T.A. Dronova: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>;
Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа проведена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Funding. The work was carried out on the Core Facility "Medical Genomics" of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-61-75>

Молекулярные особенности гастроинтестинальных стромальных опухолей «дикого типа» (*KIT/PDGFR* WT)

Н.Н. Мазуренко, В.В. Югай, И.В. Цыганова

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

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко nnmazurenko@mail.ru

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) – наиболее распространенные мезенхимальные опухоли желудочно-кишечного тракта. Их основными признаками являются экспрессия CD117 (*KIT*) и мутации в генах *KIT* или *PDGFRA* у 85 % пациентов. Однако 10–15 % ГИСО взрослых и 85 % ГИСО детей не имеют мутаций *KIT/PDGFR* (ГИСО *KIT/PDGFR* WT, или ГИСО «дикого типа»). Прогноз и клиническое течение этих опухолей и ГИСО с мутациями *KIT/PDGFR* различаются. Гастроинтестинальные стромальные опухоли «дикого типа» довольно гетерогенная группа опухолей по клиническому фенотипу, генетической этиологии и по молекулярным путям. Гастроинтестинальные стромальные опухоли разделяют на SDH-дефицитные и SDH-компетентные по комплексу сукцинатдегидрогеназы (SDH). SDH-дефицитные ГИСО встречаются преимущественно у детей и молодых пациентов с синдромом Карни–Стратакиса и триадой Карни, есть и спорадические опухоли. Более 50 % SDH-дефицитных ГИСО содержат мутации в генах *SDHA*, *SDHB*, *SDHD*, *SDHC*, а остальные вызваны гиперметилированием промотора *SDHC*. SDH-компетентные ГИСО «дикого типа» включают опухоли с мутациями *BRAF*, *RAS* или *NF1*, которые активируют RAS-RAF-МАРК-путь и подтип ГИСО *KIT/PDGFR/SDH/RAS-P* WT, или ГИСО «четырежды дикого типа». Профили генома этих опухолей и ГИСО с мутацией *KIT/PDGFR* или дефицитом SDH значительно различаются. Одной из особенностей ГИСО «четырежды дикого типа» является активация *FGFR*-сигнального пути (*FGFR* – рецепторы фактора роста фибробластов) из-за химерных генов *FGFR*, мутаций *FGFR* или гиперэкспрессии фактора роста фибробластов (*FGF*). Еще одной особенностью являются химерные гены, содержащие фрагменты генов *NTRK*, *BRAF*, *FGFR* и других, которые ведут себя как онкогены-драйверы. В ГИСО «четырежды дикого типа» выявлены соматические мутации генов *TP53*, *MAX*, *MEN1*, *CTNND2*, *CHD4*, *ARID1A* и других, а также генов клеточного цикла *RB1*, *CDK4*, *CDKN1B*. Специфического лечения для пациентов с ГИСО «дикого типа» не существует, выбор препарата обусловлен генетическим нарушением. Необходимо совершенствовать понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе различных подтипов ГИСО, для разработки более эффективных терапевтических подходов.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли *KIT/PDGFR* «дикого типа», SDH-дефицитные гастроинтестинальные стромальные опухоли, мутации *BRAF*, *RAS*, *NF1*, сигнальный путь рецепторов фактора роста фибробластов, химерные гены

Для цитирования: Мазуренко Н.Н., Югай В.В., Цыганова И.В. Молекулярные особенности гастроинтестинальных стромальных опухолей «дикого типа» (*KIT/PDGFR* WT). Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):61–75. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-61-75>

Molecular features of gastrointestinal stromal tumors “wild-type” (*KIT/PDGFR* WT)

N.N. Mazurenko, V.V. Yugay, I.V. Tsyganova

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

Contacts: Natalia Nikolaevna Mazurenko nnmazurenko@mail.ru

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most common mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract. Their main features are the expression of CD117 (*KIT*) and mutations of *KIT* or *PDGFRA* in 85 % of patients. However, 10–15 % of adult GIST and 85 % of pediatric GIST do not have *KIT/PDGFR* mutations (*KIT/PDGFR* WT GIST or “wild-type” GIST). The prognosis and clinical course of these tumors and GIST with *KIT/PDGFR* mutations differ. “Wild-type” GIST are quite heterogeneous group of tumors in terms of clinical phenotype, genetic etiology, and molecular pathways. Gastrointestinal

stromal tumors are divided into SDH-deficient and SDH-competent based on the succinate dehydrogenase (SDH) complex. SDH-deficient GIST occur predominantly in children and young patients with Carney–Stratakis syndrome and Carney triad; there are also sporadic tumors. More than half of SDH-deficient GIST contain mutations in *SDHA*, *SDHB*, *SDHD* or *SDHC*, while the rest are caused by hypermethylation of the *SDHC* promoter. SDH-competent “wild-type” GIST include tumors with *BRAF*, *RAS*, or *NF1* mutations that activate the RAS-RAF-MAPK pathway and *KIT/PDGFR*/*SDH/RAS-P* WT GIST subtype or “quadruple wild type” GIST. The genomic profiles of these tumors and GIST with *KIT/PDGFR* mutation or SDH deficiency differ significantly. One of the features of “quadruple wild type” GIST is activation of the FGFR (fibroblast growth factor receptors) signaling pathway due to chimeric *FGFR*, *FGFR* mutations, or overexpression of FGF (fibroblast growth factor). Another feature is chimeric genes containing fragments of *NTRK*, *BRAF*, *FGFR* and other genes that behave as oncogene drivers. In “quadruple wild-type” GIST the somatic mutations in *TP53*, *MAX*, *MEN1*, *CTNND2*, *CHD4*, *ARIDIA* and other genes were revealed as well as in the cell cycle genes *RB1*, *CDK4*, *CDKN1B*. There is no specific treatment for patients with “wild-type” GIST; the choice of drug is determined by the genetic disorder. There is a need to improve our understanding of the molecular mechanisms underlying the different GIST subtypes to develop more effective therapeutic approaches.

Keywords: *KIT/PDGFR* gastrointestinal stromal tumors “wild-type”, SDH-deficient gastrointestinal stromal tumors, *BRAF*, *RAS*, *NF1* mutations, signaling pathway of fibroblast growth factor receptors, chimeric genes.

For citation: Mazurenko N.N., Yugay V.V., Tsyganova I.V. Molecular features of gastrointestinal stromal tumors “wild-type” (*KIT/PDGFR* WT). *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):61–75. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-61-75>

ВВЕДЕНИЕ

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) составляют до 20 % всех саркоматозных опухолей человека и являются наиболее распространенными мезенхимальными новообразованиями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), на них приходится 1–3 % первичных злокачественных опухолей ЖКТ [1–5]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли ежегодно в большинстве стран выявляют у 11–12 человек на 1 млн жителей, хотя частота заболевания в разных странах варьирует от 4 до 22 случаев на 1 млн человек [1, 6].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли возникают во всех отделах ЖКТ из предшественников интерстициальных клеток Кахала, регулирующих перистальтику, наиболее распространены ГИСО желудка (60 %) и тонкой кишки (30 %). С 2002 г. ГИСО являются отдельной нозологической группой, их отличительной чертой является универсальная экспрессия антигена CD117 (рецептора КИТ) в результате активирующих мутаций в генах *KIT* [7] или *PDGFRA* [8, 9], кодирующих тирозинкиназные рецепторы факторов роста стволовых клеток и тромбоцитов. В 2001 г. впервые был применен ингибитор тирозинкиназ STI571 (иманитиниб мезилат, Гливек) для лечения метастатической формы ГИСО [10], что открыло эпоху таргетной терапии солидных опухолей.

За последние два десятилетия достижения молекулярной онкологии значительно улучшили наши представления о развитии ГИСО. Гастроинтестинальные стромальные опухоли – чрезвычайно гетерогенная группа опухолей, различающихся по локализации, гистологическому типу клеток, степени злокачественности, риску прогрессии и клиническому течению. Мутации в генах *KIT* и *PDGFRA* выявляют в 85–90 % ГИСО, наиболее часто мутации поражают 9, 11, 13, 17-й экзоны гена *KIT* (75 %) и 12, 14, 18-й экзоны гена

PDGFRA (10–13 %). Описаны более 300 вариантов мутаций, которые коррелируют с особенностями морфологии, локализацией, метастазированием опухолей [1–5, 11]. Установлено, что результаты молекулярного анализа могут иметь прогностическое значение. Выявление генетических нарушений изменило подходы к лечению ГИСО, привело к развитию таргетной терапии, что улучшило показатели выживаемости пациентов. Однако, несмотря на ингибирующий эффект иматиниба, у большинства пациентов развивается резистентность. Понимание механизмов лекарственной устойчивости способствовало разработке новых терапевтических стратегий и выбору мишеней. Сегодня для лечения ГИСО используют 4 линии таргетной терапии [11, 12].

Однако часть стромальных опухолей ЖКТ не содержит мутаций в генах *KIT* или *PDGFRA*, их обозначают как ГИСО *KIT/PDGFR* WT (ГИСО «дикого типа») [13–15]. Группа ГИСО «дикого типа», несмотря на малочисленность, чрезвычайно гетерогенна, выявлены альтернативные мутации, структурные хромосомные и эпигенетические изменения, что усложняет молекулярную классификацию [16]. В настоящем обзоре основное внимание уделено молекулярно-генетическим особенностям ГИСО «дикого типа» согласно исследованиям последних лет.

ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ «ДИКОГО ТИПА» (*KIT/PDGFR* WT)

Определенная часть стромальных опухолей ЖКТ – 10–15 % ГИСО взрослых и 85 % ГИСО детей – не содержит мутации в генах *KIT* или *PDGFRA* (ГИСО «дикого типа»), но экспрессирует антиген CD117 [13–16]. Средний возраст пациентов с ГИСО «дикого типа» значительно меньше (35 лет), чем пациентов с мутациями *KIT/PDGFR* (55–65 лет). Гастроинтестинальные стромальные опухоли у детей

(средний возраст 15 лет) составляют 0,4–2 % всех случаев ГИСО, пациенты имеют генетическую предрасположенность к таким новообразованиям [17].

Хотя ГИСО *KIT/PDGFR* WT довольно редкие опухоли, они представляют гетерогенную группу и различаются по этиологии, фенотипу, онкогенным мутациям и молекулярным сигнальным путям. Среди ГИСО «дикого типа» распространены опухоли с нарушением функционирования комплекса сукцинатдегидрогеназы (SDH), поэтому их разделяют на SDH-дефицитные и SDH-компетентные ГИСО [13]. Следует отметить, что все ГИСО с мутациями *KIT/PDGFR* являются SDH-компетентными (рис. 1).

SDH-ДЕФИЦИТНЫЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ

SDH-дефицитные опухоли составляют 20–40 % ГИСО «дикого типа», локализируются в желудке (составляют до 10 % всех стромальных опухолей желудка), имеют эпителиоидно-клеточный фенотип, мультиузловой рост и лимфоваскулярную инвазию [13–18]. В группу SDH-дефицитных ГИСО входят пациенты с триадой Карни, синдромом Карни–Стратакиса и спорадическими опухолями. Заболевание характерно для молодых людей, чаще женского пола, и детей.

Сукцинатдегидрогеназа играет важную роль в митохондриях, поскольку связывает цикл трикарбоновых кислот с транспортной цепью электронов дыхательной цепи. Ферментный комплекс SDH располагается на внутренней мембране митохондрий и состоит из 4 субъединиц: SDHA, SDHB, SDHC и SDHD (рис. 2). Субъединица SDHA катализирует окисление сукцината в fumarat, субъединица SDHB участвует в транспорте электронов при окислении убихинона в уби-

хинол, а субъединицы SDHC и SDHD отвечают за заякоривание комплекса на мембране [19]. Дефицит SDH приводит к укорочению цикла Кребса, нарушению обмена митохондриального дыхания и избытку глюкозы и жирных кислот [20]. Дефицит SDH вызван биаллельной инактивацией одного из 4 генов: *SDHA*, *SDHB*, *SDHC* и *SDHD* как классических генов-супрессоров [14, 15, 21, 22]. Потеря функции SDH возникает в результате комбинации наследуемой мутации с соматической потерей гетерозиготности или инактивацией 2-го аллеля. Реже утрата функции SDH происходит из-за соматической инактивации обоих аллелей.

Отсутствие SDH приводит к накоплению сукцината, что стабилизирует HIF1 α (индуцируемый гипоксией фактор 1 α), который в ядре связывается с HIF1 β (индуцируемым гипоксией фактор 1 β), с последующей индукцией транскрипции генов *IGF* и *VEGF*, что способствует активации ангиогенеза (рис. 3) [21]. Повышение экспрессии лигандов VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) и IGF1 (инсулиноподобный фактор роста 1), взаимодействующих с рецепторами VEGFR и IGF1R, стимулирует пролиферацию через сигнальные пути RAS-RAF-MAPK и PI3K-AKT [12, 14]. Повышенная экспрессия IGF1R является особенностью SDH-дефицитных ГИСО [23], поэтому определение IGF1R может быть использовано для выявления SDH-дефицитных опухолей. Из-за структурного сходства между сукцинатом и α -кетоглутаратом накопление сукцината ингибирует α -кетоглутарат-зависимые ферменты диоксигеназы, такие как семейство TET ДНК-гидроксилаз [24]. Белки TET превращают 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин, необходимый для последующего деметилирования ДНК. Таким образом, накопление сукцината из-за

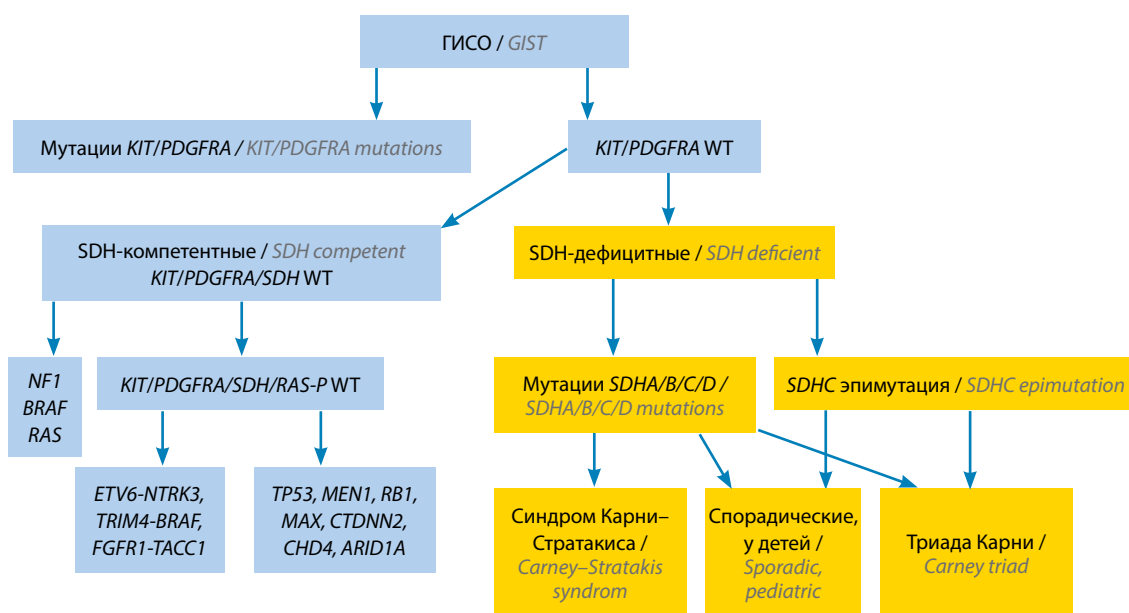


Рис. 1. Молекулярная классификация гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО)
Fig. 1. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) molecular classification

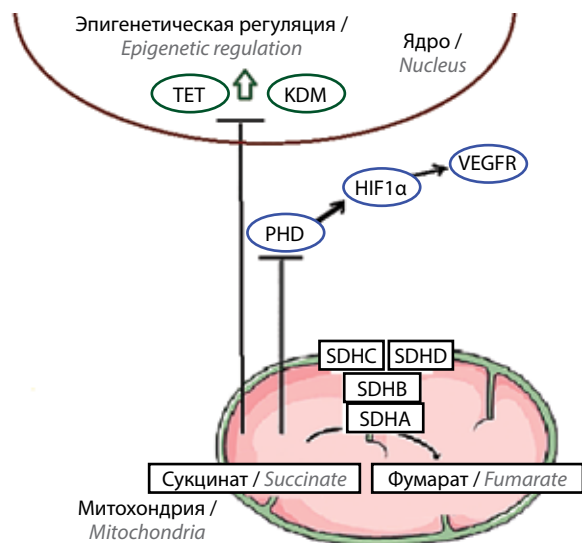


Рис. 2. Сукцинатдегидрогеназный комплекс (SDH). Дефицит SDH ведет к накоплению сукцината, что ингибирует пролил-гидроксилазу (PHD) и индуцирует стабилизацию индуцируемого гипоксией фактора 1 α (HIF1 α), а также способствует нарушению эпигенетической регуляции – деметилированию ДНК и гистонов (TET ДНК-гидроксилаза, KDM – лизин (K) деметилаза). VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов

Fig. 2. Succinate dehydrogenase complex. SDH deficiency leads to the accumulation of succinate, which inhibits prolyl hydroxylase (PHD) and induces stabilization of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α), as well as disruption of epigenetic regulation – demethylation of DNA and histones (TET – DNA hydroxylase, KDM – lysine (K) demethylase). VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor

дефицита SDH потенциально может стимулировать канцерогенез через ингибирование белков семейства TET и впоследствии изменять глобальное метилирование ДНК, влияя на экспрессию генов.

Половина SDH-дефицитных ГИСО имеют мутации генов *SDH*: чаще мутации поражают ген *SDHA* (30 % SDH-дефицитных ГИСО «дикого типа», часто вместе с мутациями *SDHB*), и 20 % SDH-дефицитных ГИСО имеют мутации генов *SDHB*, *SDHC* и *SDHD* [15, 21, 25]. Примерно у 50 % пациентов дефицит SDH вызван гиперметилированием промотора гена *SDHC*, что ведет к подавлению транскрипции и уменьшению уровня белка без наследственной предрасположенности.

Помимо ГИСО, у пациентов с герминальными мутациями любой из субъединиц SDH наблюдается спектр эндокринных и нейроэндокринных патологий, начиная от гиперплазий до неоплазий, включая параганглиому, феохромоцитому, почечно-клеточный рак, лимфому Ходжкина, хронический лимфолейкоз, рак щитовидной железы, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, опухоли гипофиза и надпочечников [21, 25].

Триада Карни. Триада Карни (Carney triad) впервые описана в 1977 г.: у 25-летней женщины были выявлены параганглиома (в 12 лет), 5 узлов лейомиосаркомы желудка (ГИСО) и хондрома легких. Далее последовали находки других авторов, а в 1999 г. Д. Карни описал

уже 79 случаев заболевания: у 17 (22 %) пациентов триада была полной, у 62 (78 %) пациентов выявлена неполная триада (2 опухоли из 3), в 2 случаях опухоли имели семейный характер, в остальных – спорадический [26]. Триада Карни редко является наследственным заболеванием [22]. У большинства пациентов, как правило, женщин молодого возраста, наблюдаются симптомы, характерные для ГИСО желудка. Иногда первым проявлением болезни являются другие новообразования, а опухоли желудка обнаруживаются во время операции или при вскрытии. Гастроинтестинальные стромальные опухоли обычно развиваются в антральном отделе желудка, часто бывают множественными и разного размера. Опухоль имеет эпителиоидную структуру и в некоторых случаях смешанную форму роста [14, 27].

В отличие от ГИСО с мутациями *KIT/PDGFR* α , которые метастазируют в печень, при триаде Карни наблюдается более высокая частота метастазирования в лимфатические узлы [14, 27]. Метастазы в лимфатических узлах отмечают у 1/4 пациентов при первичном хирургическом вмешательстве, последующие метастазы регистрируют в лимфатических узлах и печени. Примерно 15–20 % пациентов с триадой Карни умирают вследствие метастазирования ГИСО, менее часто – от метастазирования параганглиомы. Несмотря на повышенные показатели метастазирования, клиническое течение ГИСО при триаде Карни остается сравнительно вялым. Для данной группы пациентов характерны плеоморфизм и эпителиоидное строение клеток опухоли, низкий митотический индекс, что относит их к группе низкого риска [27]. При этом ГИСО отличаются устойчивой первичной резистентностью к иматинибу.

Синдром Карни–Стратакиса. В 2002 г. Стратакис и Карни описали параганглиому и ГИСО желудка у 7 мужчин и 5 женщин (средний возраст 23 года), заболевание получило название «синдром Карни–Стратакиса» [28]. Синдром наследуется по аутосомно-доминантному признаку с неполной пенетрантностью, чаще встречается у молодых женщин. В 2007 г. у пациентов с синдромом Карни–Стратакиса идентифицированы инактивирующие мутации в генах *SDHB*, *SDHD*, реже в *SDHC* [29]. Риск развития опухоли в возрасте до 50 лет при наследственной мутации гена *SDHD* составляет 86 %.

Установлено, что иммуногистохимическое определение экспрессии SDHB имеет 100 % чувствительность при анализе SDH-дефицитных опухолей (параганглиомы и феохромоцитомы). Инактивация SDH вследствие мутации или утраты любого компонента приводит к потере экспрессии SDHB из-за нестабильности вне комплекса, в связи с чем наличие экспрессии SDHB является суррогатным маркером эффективности функции комплекса SDH. Поэтому иммуногистохимическое определение SDHB представляет собой надежный метод диагностики пациентов, имеющих

SDH-дефицитные ГИСО, в том числе триаду Карни или синдром Карни–Стратакиса [30]. Так, при анализе экспрессии *SDHB* у 20 пациентов с ГИСО «дикого типа» нами был выявлен дефицит *SDH* у 13 (65 %) пациентов, из которых 6 имели неполную триаду Карни [4, 31].

Мутации гена *SDHA* наиболее распространены в SDH-дефицитных ГИСО (30 %), которые можно определить при иммуногистохимическом анализе экспрессии *SDHA*. Наблюдается строгая корреляция между отсутствием экспрессии *SDHA* и наличием мутации *SDHA* при NGS-анализе (NGS – next generation sequencing, секвенирование нового поколения) [32, 33]. Мутации возникают в разных экзонах гена *SDHA* (15 экзонов), превалирует замена в 20-м экзоне (с.91G>T, р. R31X), приводящая к обрыву белковой цепи. Часто пациенты с *SDHA*-дефицитными ГИСО имеют также мутации *SDHB*. Так, при исследовании 127 *SDHB*-отрицательных ГИСО в 28 % (36/127) опухолей отсутствовала экспрессия *SDHA*, ни у кого из пациентов не было парагангиомы или хондромы [33]. *SDHA*-отрицательные ГИСО присутствовали у более возрастных пациентов (средний возраст 34 года против 21 года, 1/3 пациентов старше 40 лет – 40–83 года). *SDHA*-отрицательные ГИСО имели более низкий митотический индекс и, несмотря на более высокую частоту метастазов в печень, отмечено медленное течение заболевания.

Мутации гена *SDHA* характерны для триады Карни, но их находят и в спорадических опухолях [25]. Отсутствие экспрессии *SDHA* вследствие герминальной мутации наблюдали у пациентов с синдромом Карни–Стратакиса с вялым течением заболевания. Показатели общей выживаемости пациентов с ГИСО с дефицитом *SDHA* выше, чем пациентов с другими вариантами ГИСО «дикого типа» или мутациями *KIT/PDGFR* [34].

Для пациентов с метастатическими ГИСО с мутацией *SDHA* показана длительная выживаемость при применении после иматиниба, сунитиниба или регорафениба [25, 34]. Хорошие результаты наблюдаются при лечении SDH-дефицитных ГИСО у детей сунитинибом, который ингибирует *VEGFR* и *IGF1R* [17]. Поскольку повышенная экспрессия *IGF1R* является особенностью SDH-дефицитных ГИСО, проводится II фаза тестирования тирозинкиназного ингибитора *IGF1R* линситиниба, однако пока объективный ответ получен не был [35].

По разным данным, почти в 50 % SDH-дефицитных ГИСО инактивация комплекса SDH происходит вследствие гиперметилирования промотора гена *SDHC* (так называемая эпимутация *SDHC*) [36, 37]. Гиперметилирование отсутствует у пациентов с синдромом Карни–Стратакиса и парагангиомой [36]. Пациентки – молодые женщины с триадой Карни или спорадическими ГИСО. Гиперметилирование может быть как наследственным, так и спорадическим.

Таким образом, 5–10 % ГИСО или 20–40 % ГИСО «дикого типа» являются SDH-дефицитными, из них более 20 % опухолей содержат герминальные мутации генов *SDHB* (чаще), *SDHC* и *SDHD*. У таких пациентов наблюдаются клинические признаки синдрома Карни–Стратакиса, они плохо реагируют на иматиниб. Треть SDH-дефицитных ГИСО содержат мутации гена *SDHA* (часто одновременно с *SDHB*), что наиболее характерно для пациентов с триадой Карни. У остальных SDH-дефицитных ГИСО имеет место гиперметилирование промотора гена *SDHC*. Прогноз пациентов с SDH-дефицитными ГИСО относительно благоприятный. Несмотря на низкую смертность пациентов с SDH-дефицитными ГИСО, при прогрессировании заболевания хирургическое лечение неметастазировавших опухолей является актуальным. SDH-дефицитные ГИСО резистентны к иматинибу, но чувствительны к сунитинибу и регорафенибу.

СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА-КОМПЕТЕНТНЫЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ

Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутациями *KIT/PDGFR* практически всегда SDH-компетентны, хотя описаны единичные случаи ГИСО с мутациями *KIT*, которые содержат нарушения SDH [15]. Среди SDH-компетентных ГИСО «дикого типа» выделяют опухоли с мутациями генов, активирующих *MAPK*- (*BRAF*, *RAS*, *NF1*), *PI3K*- (*PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN*), *STAT*- или *IGF1R*-сигнальные пути [38–40].

СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА-КОМПЕТЕНТНЫЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ *KIT/PDGFR* WT С МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ *RAS-RAF-MAPK*-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ

К SDH-компетентным ГИСО «дикого типа» относят опухоли с мутациями генов *BRAF*, *RAS* или *NF1* (так называемые *RAS*-P-мутантные ГИСО), белковые продукты которых участвуют в передаче сигнала в сигнальном пути *RAS-RAF-MEK-ERK* (см. рис. 3).

Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутациями *BRAF*. Мутации гена *BRAF* находят в 4–13 % ГИСО «дикого типа», более 90 % мутаций – *BRAF* (р. V600E) [38–40]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутациями *BRAF* фенотипически и морфологически сходны с ГИСО с мутациями *KIT/PDGFR*, спорадически возникают в разных отделах ЖКТ, чаще в тонкой кишке, имеют веретенчатое или смешанное строение и характеризуются экспрессией *KIT*. Митотический индекс, как и размеры опухоли, широко варьирует, высокий риск прогрессии имеют 54 % опухолей [40]. Опухоли с высокой митотической активностью чаще встречаются в тонкой кишке, у женщин среднего возраста и характеризуются ранним метастазированием. Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутацией *BRAF* резистентны к мультикиназным ингибиторам: иматинибу [41],

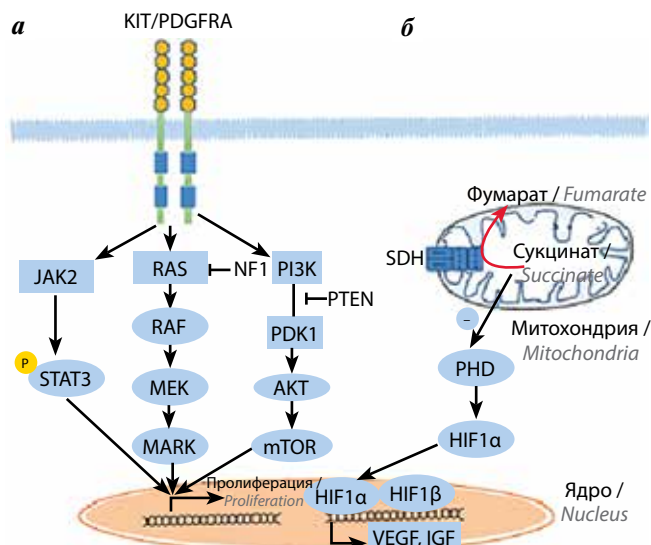


Рис. 3. Ключевые сигнальные пути в гастроинтестинальных стромальных опухолях (ГИСО): а – онкогенные мутации *KIT* и *PDGFRA* инициируют активацию *STAT*-, *MAPK*- и *PI3K*-сигнальных путей в ГИСО; б – дефицит дефицит сукцинатдегидрогеназы (*SDH*) вызывает накопление сукцината, что способствует накоплению индуцируемого гипоксией фактора 1α (*HIF1α*), который поддерживает образование опухоли путем активации ангиогенеза. [11]. *NF1* – нейрофибромин; *AKT* – серин-треонин протеинкиназа, *PDK1* – фосфоинозитидзависимая киназа 1; *mTOR* – мишень рапамицина млекопитающих; *PI3K* – фосфатидилинозитол-3-киназа; *PHD* – пролил-гидроксилаза; *HIF1β* – индуцируемый гипоксией фактор 1β; *VEGF* – фактор роста эндотелия сосудов; *IGF* – инсулиноподобный фактор роста

Fig. 3. Key signaling pathways in gastrointestinal stromal tumors (GIST): а – *KIT* or *PDGFRA* oncogenic mutations initiate activation of *MAPK*, *PI3K* and *STAT* signaling pathways in GIST; б – succinate dehydrogenase (*SDH*) deficiency causes the accumulation of succinic acid which contributes to the accumulation of hypoxia-inducible factor 1-α (*HIF1α*), which supports tumor formation by activating angiogenesis [11]. *NF1* – neurofibromine; *mTOR* – target of mammalian rapamycin; *PI3K* – phosphatidylinositol-3-kinase; *PHD* – prolyl-hydroxylase; *HIF1β* – of hypoxia-inducible factor 1-β; *VEGF* – vascular endothelial growth factor; *IGF* – insulin-like growth factor

сунитинибу, сорафенибу [42], однако реагируют на дабрафениб [43] и регорафениб [44].

Нами при исследовании 45 пациентов с ГИСО «дикого типа» выявлены 6 (13,3 %) опухолей с мутацией *BRAF* (p.V600E). Большинство пациенток – женщины ($n = 5$), 4 опухоли возникли в желудке, 2 – в тощей кишке, метастазы отсутствовали, 10-летняя общая выживаемость составила 84 % [4].

Одновременное присутствие мутаций *BRAF* и *KIT* или *BRAF* и *PDGFRA* встречается крайне редко – в 2 % всех случаев ГИСО [41, 45]. В экспериментах *in vitro* по изучению функции двойного фенотипа показано, что иматиниб может ингибировать активность мутантного *KIT*, но не нисходящий сигнальный путь, опосредованный сопутствующей мутацией *BRAF*, что может быть причиной первичной резистентности ГИСО к иматинибу [41].

Высокая частота мутаций *BRAF* (p.V600E) (15 %) выявлена в малых ГИСО размером <2 см, которые от-

личаются высокой частотой генетических нарушений на ранних стадиях образования опухоли [46]. Описаны редкие ГИСО, содержащие слитные гены, включающие ген *BRAF* (см. ниже).

Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутациями *RAS*. Имеются редкие сообщения о мутациях в ГИСО генов семейства *RAS*, кодирующих мембранно-связанные ГТФазы, участвующие в активации *MAPK*-сигнального пути. Мутации *KRAS* выявлены в 5 % (3 из 60) ГИСО с мутациями *KIT/PDGFRA* [41], тогда как при анализе 514 случаев мутации *KRAS* обнаружены не были и, проведя метаанализ, авторы пришли к выводу, что частота мутации *KRAS* в ГИСО составляет менее 0,2 % [47]. Одновременное наличие мутации *KRAS* (p. G12V) и мутации в 11-м экзоне *KIT* показано в ГИСО у пациента с дедифференцированной опухолью, утратившей экспрессию CD117 после терапии иматинибом [48]. Аналогичный случай описан в другой работе, где авторы указывают на поликлональное происхождение ГИСО и наличие в первичной опухоли наряду с мутацией *KIT* клона клеток с мутацией *KRAS*, рост которого усиливается после терапии ингибиторами *KIT/PDGFRA* [49].

Внедрение NGS позволило выявить редкие случаи ГИСО с мутациями *KRAS*, *HRAS* или *NRAS*. При анализе 267 ГИСО выявлены 15 (5,6 %) ГИСО «дикого типа», у 1 пациента обнаружена мутация *KRAS* (p.G12V) как в первичной опухоли желудка, так и после терапии иматинибом. Опухоль оказалась *SDH*-дефицитной (отсутствовала экспрессия *SDHB*), не реагировала на тирозинкиназные ингибиторы, пациент скончался через 24 мес [50].

Китайские исследователи при NGS-анализе 40 ГИСО выявили 12 (31,6 %) ГИСО «дикого типа», из которых 2 опухоли содержали мутацию *NRAS* (p.G12D) и по одной опухоли с мутациями *KRAS* (p.G12C), *HRAS* (p.G12S) и *BRAF* (p.G464E). Еще в 4 ГИСО одновременно с мутацией *KIT* присутствовали мутации *KRAS*, *NRAS* или *BRAF*. В этой работе мутации *BRAF* выявлены в 7,5 % ГИСО [51].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли, ассоциированные с нейрофиброматозом 1-го типа. Наиболее ранним и типичным признаком заболевания являются пигментные пятна размером >1,5 см (нейрофибромы). Также оно характеризуется феохромоцитомой, ампулярным карциноидом и ГИСО [52].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли возникают в 5–25 % случаев нейрофиброматоза 1-го типа, возраст пациентов на 10 лет меньше, чем пациентов с мутациями *KIT/PDGFRA* [53]. Опухоли располагаются в тонкой кишке, чаще в двенадцатиперстной или тощей кишке, имеют веретенчатое строение и экспрессируют *KIT* (CD117). Митотический индекс, как и размеры опухоли, значительно варьируют, большинство ГИСО имеют злокачественное течение [52, 53].

Нейрофиброматоз 1-го типа наследуется по ауто-сомно-доминантному признаку и развивается на фоне

мутации или биаллельной потери гена *NF1*. Ген-супрессор опухоли *NF1* находится на хромосоме 17q11.2 и кодирует нейрофибромин (NF1), который подавляет сигнальный путь RAS-RAF-МЕК-ERK [54]. Белок NF1 негативно регулирует ГТФазы RAS, мутации приводят к утрате ингибиторной роли NF1 и активации RAS. Более распространены соматические мутации *NF1* (60 экзонов), в гене нет мутационных «горячих точек», поэтому практически все данные по мутациям получены с использованием NGS.

Мутации *NF1* обнаружены в 60 % (13 из 22) ГИСО *KIT/PDGFR/SDH/RAS-PWT*, причем 7 из 11 пациентов имели NF1-синдром (нейрофиброматоз 1-го типа), поскольку мутации *NF1* были выявлены в нормальных тканях [55]. Недавно идентифицированы ГИСО с мутацией со сдвигом рамки гена *NF1* в ненаследственных, спорадических случаях [56]. У этих же пациентов найдена мутация со сдвигом рамки гена *MYC*, ассоциированная с потерей функции фактора MAX, что характерно для ГИСО с мутацией *KIT*.

Мутации *NF1* часто присутствуют в ГИСО одновременно с мутациями *KIT*. В работе китайских авторов мутации *NF1* выявлены в 8 % (23/267) ГИСО и 46 % этих опухолей имели мутации *KIT* [57]. При этом не наблюдалось различий в возрасте, поле и локализации опухоли у пациентов с мутацией *NF1* и присутствием мутации *KIT*.

Прогноз ГИСО, ассоциированных с нейрофиброматозом 1-го типа, неоднозначен. Примерно 20 % пациентов умирают от прогрессирования заболевания [14]. M. Miettinen и соавт. сообщили об общем хорошем прогнозе с длительным наблюдением (медиана общей выживаемости составила 13,6 года), при этом из 35 пациентов с ГИСО, ассоциированными с нейрофиброматозом 1-го типа, только 5 человек (с ГИСО двенадцатиперстной кишки) умерли от метастазов [52]. В нашей работе среди 45 больных с ГИСО «дикого типа» было 2 пациента с нейрофиброматозом 1-го типа и агрессивной опухолью двенадцатиперстной кишки с метастазами на брюшине, общая выживаемость которых составила всего 36 и 48 мес [4]. Данных о лечении ГИСО, ассоциированных с нейрофиброматозом 1-го типа, мало, имеются единичные сообщения об эффективности иматиниба у данной группы больных [53].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутациями гена *EGFR*. Среди ГИСО «дикого типа» обнаружены опухоли с повышенной экспрессией EGFR (рецептора эпидермального фактора роста) и мутациями гена *EGFR* в 19-м (p. del E746-A750) или 21-м (p.A859T) экзонах. Это небольшие ГИСО размером 2,5–4,5 см, которые чаще встречаются у женщин, преимущественно в желудке, имеют низкий риск прогрессии и относительно благоприятный прогноз. Три случая ГИСО с мутациями *EGFR* выявлены среди 88 (3,4 %) ГИСО «дикого типа» при анализе 323 ГИСО. Опухоли

с мутацией *EGFR* не имели мутаций *KIT/PDGFR/ BRAF/RAS-P* [58].

ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ С МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ PI3K-mTOR-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ

Ген *PIK3CA* (α -каталитическая фосфатидилинозитол-3-киназа) кодирует p110a субъединицу PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназы), которая активируется рецепторами с тирозинкиназной активностью, в частности KIT. Изменения регуляции PI3K-сигнального пути запускают активацию PDK1 (фосфоинозитидзависимая киназа 1) и АКТ и далее mTOR-сигналинг, участвуя в регуляции апоптоза, пролиферации и миграции клеток.

Мутации *PIK3CA* встречаются в ГИСО не более чем в 2 % случаев, обычно в опухолях, содержащих мутации *KIT* [49, 59]. Среди 27 образцов ГИСО «дикого типа» выявлена 1 опухоль высокого риска (опухоль желудка размером 8 см с 62 митозами в 50 полях зрения), содержащая мутации *HRAS* (p.G12V) и *PIK3CA* (p. H1047R). Мутация *PIK3CA* (p.H1047R) является онкогенной, встречается в 20 % различных опухолей и редко присутствует одновременно с мутацией *RAS* [49]. Новые редкие мутации *PIK3CA* выявлены в 8 первичных и 2 метастатических ГИСО с мутациями *KIT* при NGS-анализе 529 пациентов, не получавших лечение иматинибом [59]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли с мутацией *PIK3CA*, как правило, представляют собой опухоли большого размера (в среднем 14 см) с агрессивным клиническим течением. Сопутствующее наличие мутации *PIK3CA* может быть причиной первичной резистентности к иматинибу у пациентов с ГИСО с мутацией *KIT* или *PDGFR* [59]. Применение ингибиторов PI3K/mTOR для лечения пациентов с ГИСО с мутацией *PIK3CA* проблематично.

Активация mTOR-пути, независимая от KIT-сигналинга, была показана в иматиниб-резистентных ГИСО. Эта активация имеет место за счет онкогенных мутаций в *PIK3CA* или инактивации опухолевого супрессора PTEN, потенциального негативного регулятора PI3K-mTOR-пути, блокирующего данный сигнальный путь, дефосфорилируя инозитол PIP3 в PIP2. Снижение экспрессии PTEN может наблюдаться также за счет гиперметилирования промотора *PTEN* при лечении сунитинибом. Таким образом, нарушение экспрессии PTEN связано с прогрессией ГИСО и является показателем плохого прогноза [60].

Недавно выявлены новые генетические нарушения, ведущие к активации сигнального пути PI3K-AKT-TSC-mTOR в злокачественных ГИСО с мутацией *KIT* [61]. В 3 (21 %) из 14 ГИСО с мутацией *KIT* обнаружены мутации в гене *PIK3CB* (p.D1067V), кодирующем PI3K110 β -субъединицу, в гене *TSC2* (p.K347R), кодирующем туберин-склерозирующий комплекс 2, и в гене *mTOR* (p. L2209V), т.е. каждая мутация выявлена в 7 % ГИСО [61].

ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ *KIT/PDGFR/SDH/RAS-PWT* (ГИСО «ЧЕТЫРЕЖДЫ ДИКОГО ТИПА»)

Примерно 50 % ГИСО «дикого типа» или 5 % всех ГИСО не имеют мутаций генов *SDH* и *RAS-P* (*RAS*, *BRAF*, *NF1*) и их обозначают как *KIT/PDGFR/SDH/RAS-P WT*, или quadruple wild type, или quadruple negative GIST (qWT) (ГИСО «четырежды дикого типа») [62].

Активация FGFR-сигнального пути в гастроинтестинальных стромальных опухолях «дикого типа». Активация FGFR-сигнального пути является наиболее частым нарушением ГИСО «четырежды дикого типа» за счет химерных генов *FGFR*, мутаций *FGFR* или гиперэкспрессии лигандов [62–66]. Семейство FGF/FGFR включает 4 *FGFR* и 18 лигандов, которые регулируют различные физиологические процессы и вовлечены в онкогенез разных опухолей. Комплекс FGF/FGFR состоит из 2 молекул *FGFR*, 2 молекул лиганда FGF и 1 цепи гепарансульфат протеогликана (HSPG). Взаимодействие FGF/FGFR активирует 4 пути передачи сигнала: RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT, STAT и PLC [64–66].

Патогенетическая роль нарушений FGF/FGFR (транслокации, дубликации или активирующие мутации) показана в 1–2 % ГИСО «дикого типа» [65]. В ГИСО отмечена дубликация на хромосоме 11q33 локуса, содержащего гены *FGF3/FGF4*, также выявлены мутации гена *FGFR1*, кодирующего рецептор для FGF4 [62, 63]. Использование NGS позволило обнаружить ГИСО с химерными генами *FGFR1* [63]. При NGS-анализе 24 случаев ГИСО «четырежды дикого типа» был выявлен 1 пациент с мутацией *FGFR1* (p.K656E) и 3 пациента с химерными генами *FGFR1-HOOK3* и *FGFR1-TACC1* (2) [63]. Образование слитных генов происходит со сдвигом рамки в 17-м интроне гена *FGFR1* (1–17-й экзоны) и 4-м интроне гена *HOOK3* (5–22-й экзоны) или в 6-м интроне гена *TACC1* (7–13-й экзоны). При этом в химерном белке внеклеточный, трансмембранный и киназные домены рецептора *FGFR1* остаются интактными. Такие слитные белки выявлены и в других опухолях, что подтверждает их онкогенность. В другой работе сообщалось о мутации *FGFR1* (p. N546K) в ГИСО «четырежды дикого типа» [67]. По результатам двух вышеуказанных исследований нарушения *FGFR1* выявлены в 10,5 % (5 из 38) случаев ГИСО «четырежды дикого типа». Чаще опухоли развиваются в тонком кишечнике. В ГИСО «четырежды дикого типа» также наблюдается дубликация локуса *FGF4*, что ведет к гиперэкспрессии лиганда FGF4. Считают, что взаимодействие FGF4-FGFR1 активирует AKT-путь.

Мутации *FGFR1* и образование слитных генов характерны для ГИСО «четырежды дикого типа», тогда как амплификации выявляют и в других ГИСО. В *SDH*-дефицитных ГИСО наблюдается глобальное гиперметилирование [37], что приводит к гиперэкспрессии лигандов FGF3 и FGF4 [68]. При этом лиганд FGF4 экспрессируется не в ГИСО с мутациями

KIT/PDGFR/SDH, а только в ГИСО с дефицитом *SDH* или в ГИСО «четырежды дикого типа» [69, 70]. Эти данные подчеркивают значимость FGF-сигналинга в ГИСО, лишенных мутаций *KIT/PDGFR/SDH* или активации RAS-пути, и позволяют предполагать, что аутокринная петля FGF4, мутации *FGFR* в ГИСО с дефицитом *SDH* или в ГИСО «четырежды дикого типа» действуют как суррогат изменений *KIT/PDGFR/SDH* [65].

Активация FGFR-сигнального пути была использована для разработки рациональной таргетной терапии ГИСО [64, 65]. Важно отметить, что FGFR-сигналинг вовлечен в механизм устойчивости к иматинибу, который является препаратом 1-й первой линии терапии ГИСО с мутациями *KIT*. Наблюдается гиперэкспрессия FGF2 в клеточных линиях и первичных ГИСО, устойчивых к иматинибу [69, 70]. Иматиниб стимулирует миграцию, инвазию и образование колоний опухолевых клеток через активацию FGF2/FGFR-аутокринной петли. Взаимодействие FGF2 с рецепторами *FGFR1* или *FGFR3* сохраняет передачу сигнала по MAPK-пути при лечении иматинибом [70] и поддерживает фосфорилирование *KIT* в иматиниб-резистентных опухолях [69]. Накопление рецептора *FGFR2* [70] или лиганда FGF2 [71] также может быть дополнительным механизмом, связанным с резистентностью к иматинибу. Подавление FGF2/FGFR восстанавливает чувствительность к иматинибу у пациентов с иматиниб-резистентными ГИСО. Существует ряд ингибиторов тирозинкиназных рецепторов *FGFR1–4*, в частности BGJ398, который подавляет активацию ERK [64, 65]. Было показано *in vitro* и на ксенографтах опухолей, что комбинированное ингибирование *KIT* иматинибом и *FGFR* ингибитором BGJ398 или блокирование FGF2 антителами приводит к повышению эффективности терапии; это позволяет ожидать более длительную выживаемость без прогрессирования у пациентов, получавших комбинацию иматиниба и BGJ398 [71, 72].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли *KIT/PDGFR/SDH/RAS-P WT* с химерными генами. Совершенствование методов секвенирования привело к открытию в ГИСО *KIT/PDGFR/SDH/RAS-P WT* хромосомных перестроек с образованием химерных генов, содержащих фрагменты генов *NTRK*, *BRAF*, *FGFR* (см. выше) и др.

Гастроинтестинальные стромальные опухоли с химерными генами *NTRK*. Гастроинтестинальные стромальные опухоли «четырежды дикого типа» со слитным геном *ETV6-NTRK3* были описаны в 2016 г. независимо двумя группами исследователей [63, 73]. Химерный ген *ETV6-NTRK3* впервые обнаружен у 44-летнего пациента в ГИСО прямой кишки, причем у пациента в течение 44 мес после операции не было признаков прогрессирования опухоли [73]. Гастроинтестинальная стромальная опухоль имела эпителиоидное строение с высоким митотическим индексом (34 митоза/5 мм²). Другая группа авторов обнаружила

химерный ген *ETV6-NTRK3* у пациентов 54 и 55 лет в опухолях прямой и тонкой кишки при NGS-анализе 29 ГИСО «четырежды дикого типа» [63].

Семейство генов *NTRK* (нейротрофической тропмиозин-родственной рецепторной тирозинкиназы) включает гены *NTRK1*, *NTRK2* и *NTRK3*, кодирующие рецепторы TRKA, TRKB, TRKC, которые активируются факторами роста нервов, мозга и нейротрофинами [74]. Слитные *NTRK*-гены ведут к постоянной активации или гиперэкспрессии TRK-рецепторов, они являются первичными драйверами для многих новообразований. Их чаще выявляют в мезенхимальных опухолях разной локализации, которые клинически и морфологически гетерогенны, в том числе в фибросаркомах у детей. Слитный ген *ETV6-NTRK3* содержит на 5'-конце 1–5-й экзоны *NTRK3* и 14–19-й экзоны *ETV6*, при этом сохраняется киназный домен *ETV6*, что выявляют при разных вариантах секвенирования или методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [75]. Белки TRK выявляют иммуногистохимически с антителами к рап-TRK [75, 76]. Однако иммуногистохимический метод менее чувствителен и хуже выявляет продукты гена *NTRK3*, поэтому требуется дополнительное секвенирование или FISH [75, 77]. Важно дифференцировать ГИСО со слитным геном *NTRK* от других сарком ЖКТ, которые содержат гены *NTRK1* или *NTRK3* [75]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли с химерным геном *NTRK* очень редки, чаще встречаются в опухолях прямой кишки, не поддаются лечению иматинибом [63, 74]. В экспериментах *in vitro* показано, что ген *ETV6-NTRK3* ассоциирован с активацией IGF1R-сигнального пути, и опухолевые клетки чувствительны к подавлению IGF1R [67].

TRK-ингибиторы 1-й линии: ларотректиниб (АТФ-зависимый ингибитор TRK) и энтректиниб (мультикиназный ингибитор TRK, ROS1 и ALK) одобрены для лечения солидных опухолей со слитными генами *NTRK*, в том числе ГИСО [75, 78, 79]. При лечении ларотректинибом у 79 % (121 из 159) пациентов с опухолями, содержащими химерные *NTRK*-гены, наблюдался объективный ответ, из них у 16 % (24 пациента) был полный ответ [79]. TRK-ингибиторы 2-го поколения: репотректиниб (мультикиназный ингибитор TRK, ROS1 и ALK) [80] и селитректиниб показали обнадеживающую активность у пациентов с прогрессированием заболевания из-за приобретенных мутаций в TRK-киназе после лечения ларотректинибом или энтректинибом [75, 80].

Гастроинтестинальные стромальные опухоли с химерными генами *BRAF*. В ГИСО «четырежды дикого типа» выявлены несколько химерных генов, включающих не 15-й экзон, а другие экзоны *BRAF* [81–83]. Обычно эти пациенты более молодого возраста. Так, у 34-летней беременной женщины с ГИСО тонкой кишки «дикого типа» размером 14 см выявлен слитный ген *PRKAR1B-BRAF*, состоящий 2–9-го экзонов

PRKAR1B (фрагмент кодирует регуляторную субъединицу цАМФ-зависимой протеинкиназы А) и 9–18-го экзонов *BRAF* (фрагмент кодирует киназный домен) [81]. Выявление химеры позволило избежать адьювантной терапии иматинибом, и женщина благополучно родила в 40 нед здорового ребенка.

Ген *AGAP3-BRAF* (включает 11-й экзон *AGAP3* и 10-й экзон *BRAF*) выявлен в ГИСО тонкой кишки размером 2,8 см у 40-летней женщины [82]. Ген *MKRN1-BRAF* (включает 4-й экзон *MKRN1* и 11-й экзон *BRAF*) обнаружен в опухоли размером 7,3 см в дистальной части пищевода у 37-летней женщины [82]. Обе опухоли были веретенноклеточного типа и проявили низкую экспрессию KIT (CD117). Ген *TRIM4-BRAF* (включает 6-й экзон *TRIM4* и 10-й экзон *BRAF*) выявлен в 2,5 см опухоли желудка у 64-летнего мужчины [83]. Любопытно, что все 4 гена (*AGAP3*, *MKRN1*, *TRIM4* и *BRAF*) находятся на длинном плече хромосомы 7 (7q), т.е. имеет место внутривнутрихромосомная перестройка [82, 83]. Поскольку *BRAF*-содержащие опухоли резистентны к иматинибу, для их лечения предлагают использовать сорафениб, дабрафениб или ингибиторы MEK [82].

Исследование опухолей и клеточных линий, полученных из опухолей от пациентов с ГИСО, устойчивых к иматинибу, позволило выявить новые слитные гены *EIF3K-ACTN4*, *SYNCRIP-SNX14* и *EXOC2-AK7* [84]. В частности, химерный ген *EXOC2-AK7* включает фрагмент в 742 нуклеотида гена *EXOC2* на хромосоме 6, который кодирует IPT/TIG-домен онкобелка MET, и фрагмент в 617 нуклеотидов гена *AK7* на хромосоме 14, кодирующий DYPY-30-мотив. Новый слитный ген *EXOC2-AK7* (1359 нуклеотидов) встроился в геном клеток и экспрессировался в цитоплазме [84]. В ГИСО «четырежды дикого типа» также были обнаружены химерные гены *MARK2-PPF1A1* и *SPRED2-NELFCD* [67].

В заключение следует указать, что группа ГИСО «четырежды дикого типа» также гетерогенна. Полногеномное и транскриптомное секвенирование показало, что в ГИСО *KIT/PDGFR/SDH/RAS-P* WT частота мутаций ниже, чем в ГИСО с мутациями *KIT*, хотя спектр мутаций сходен, преобладают замены C>T/G>A [85]. Часто в ГИСО «дикого типа» имеются мутации генов клеточного цикла *RBI*, *CDK4*, *CDKN1B*, что стало известно при внедрении методов полногеномного секвенирования. В NGS-исследованиях ГИСО «четырежды дикого типа» были выявлены мутации в генах *TP53*, *MEN1*, *MAX*, *CHD4*, *FGFR1*, *CTDNN2*, *CBL*, *ARID1A*, *BCOR*, *ATRX*, *NFI*, *MSH2*, *PMS1*, *DICER*, *VHL* и *APC* [15, 50, 63, 67, 74, 85].

Частота мутаций указанных генов может быть довольно высокой, при этом в опухоли одновременно присутствуют несколько мутантных генов. Китайские авторы при исследовании 1022 ГИСО определили 142 (13,9 %) ГИСО «дикого типа» [86]. Далее при использовании NGS к 425 генам установили, что 50 % из 142 ГИСО *KIT/PDGFR* WT – 72 случая, или 7 % (72/1022)

всех ГИСО, составляют ГИСО «четырежды дикого типа». Наиболее частыми в ГИСО «четырежды дикого типа» были мутации генов *TP53* — в 27,8 % (20/72) и *RBI* — в 25,0 % (18/72), причем одновременно мутации двух генов в одной опухоли не обнаружены, хотя в опухолях с мутациями *TP53* выявлены другие мутантные гены. В более чем 20 % опухолей определены мутации *ALK*, *PKHD1*, *PIK3CA* и в 16–19 % опухолей — мутации *DAXX*, *POLE*, *CCNE1*, *XPC*, *CTNNB1*, *MLLT3*, *RPTN1*. Всего в ГИСО «четырежды дикого типа» выявлены мутации более 40 генов [86].

СТРАТЕГИИ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ «ДИКОГО ТИПА»

Открытие мутаций *KIT* и *PDGFRA* и последующее внедрение низкомолекулярных ингибиторов рецепторных тирозинкиназ привели к революции в лечении распространенных и метастатических ГИСО, поскольку хирургическая резекция долгое время оставалась единственным методом лечения локализованного заболевания. Несмотря на очевидный противоопухолевый эффект иматиниба, возникающая лекарственная устойчивость не препятствовала прогрессированию заболевания. Это потребовало разработки целого ряда новых тирозинкиназных ингибиторов, действие которых зависит от типа мутации. Для лечения пациентов с ГИСО с мутациями *KIT*, у которых возникла устойчивость к иматинибу, были выбраны сунитиниб во 2-й линии, регорафениб в 3-й линии, рипретиниб в 4-й линии терапии. Авапритиниб был одобрен для лечения пациентов с ГИСО с мутацией *PDGFRA D842V*, которые резистентны к указанным препаратам [11, 12, 18] (табл. 1).

Гастроинтестинальные стромальные опухоли «дикого типа» практически не реагируют на тирозинкиназные ингибиторы, к которым чувствительны ГИСО с мутациями *KIT* [5, 15, 87, 88]. При лечении 377 пациентов с ГИСО иматинибом риск прогрессии был на 106 %, а риск смерти на 76 % выше у больных с ГИСО «дикого типа», чем у больных с мутациями в 11-м экзоне *KIT* [87]. Использование иматиниба в адьювантном режиме не улучшило показатели общей выживаемости пациентов с ГИСО «дикого типа» [88]. Несколько лучше ответ у пациентов с ГИСО *KIT/PDGFRA WT* на сунитиниб: выживаемость без прогрессирования и общая выживаемость у этой группы больных выше, чем у пациентов с мутациями в 11-м экзоне *KIT* [89].

Изучение отдельных подтипов ГИСО показало, что SDH-дефицитные ГИСО резистентны к иматинибу, но могут быть чувствительны к ингибиторам VEGFR: сунитинибу [15] или регорафенибу [90]. Так, 18 % пациентов с ГИСО с дефицитом SDH ответили на сунитиниб [15], особенно чувствительны к сунитинибу опухоли у детей [17] (табл. 2). Объективный ответ наблюдался у SDH-дефицитных ГИСО при использовании регорафениба [90], но отсутствовал у SDH-компетентных ГИСО дикого типа. Возможен положитель-

ный эффект у SDH-дефицитных ГИСО и при использовании других ингибиторов VEGFR — сорафениба или пазопаниба.

Новый ингибитор тирозинкиназ линситиниб, ингибирующий IGF1R, стабилизирует заболевание у 40 % пациентов с ГИСО «дикого типа» в течение 9 мес, выживаемость без прогрессирования составила 52 %, однако объективных ответов не наблюдалось [35]. Ингибиторы BRAF дабрафениб и регорафениб могут быть эффективны у пациентов с ГИСО с мутациями BRAF [43, 44]. Пролиферация опухолевых клеток с химерным геном *ETV6-NTRK3* подавляется ингибитором TRK ларотректинибом, а также мультикиназными ингибиторами ALK энтректинибом и репотректинибом, которые подавляют NTRK-киназы [75, 78, 80].

Резистентность к иматинибу, как предполагают, может быть восстановлена ингибированием FGFR3 [69]. Экспрессия FGF2, лиганда FGFR3, повышает резистентность к иматинибу. Подавление FGF2/FGFR восстанавливает чувствительность к иматинибу у пациентов с иматиниб-резистентными ГИСО. Изучается возможность комбинированного ингибирования ГИСО иматинибом и ингибитором FGFR (BGJ398) или блокирование FGF2-антителами с целью повышения эффективности терапии [71, 72].

Ученые пытаются воздействовать на ГИСО с помощью новых препаратов и методов лечения или комбинировать классические терапевтические варианты (иматиниб) с иммунотерапией. В литературе цитируют более 300 клинических испытаний новых препаратов, включающих более чем 86 молекул, для терапии ГИСО [91]. Иммунотерапия опухолей, в том числе ГИСО, сегодня очень актуальна [91, 92]. Иммунотерапевтическими агентами, используемыми в клинических испытаниях, являются молекулы анти-PD-1/PD-L1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 и CTLA-4 [91, 92]). Однако только 4 препарата (иматиниб, дазатиниб, акситиниб и рибоциклиб) были протестированы в сочетании с иммунотерапией в клинических испытаниях [91].

Считают, что мутационный статус ГИСО не только предсказывает ответ на таргетную терапию, но и способен оказывать влияние на иммунное микроокружение опухоли и характер иммунного ответа. Экспрессия иммунных молекул, таких как антиген активации Т-клеток CD26 [92] и PD-L1, имеет прогностическое значение [93, 94]. Повышенная экспрессия CD26 и сниженная экспрессия PD-L1 сопряжены с более высоким риском метастазирования. Экспрессия PD-L1 связана с вероятной активацией путей интерферонов α (IFN α) и γ (IFN γ) и фактора некроза опухоли α (TNF α), что указывает на положительную корреляцию с цитотоксическим ответом Т-клеток [94].

Прямое экспериментальное исследование указывает на возможную терапевтическую роль интерферонов именно у пациентов с ГИСО «дикого типа» [95]. Оно

Таблица 1. Чувствительность гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) с мутациями *KIT*/*PDGFRA* к тирозинкиназным ингибиторам [12, 18]

Table 1. Sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GIST) with *KIT*/*PDGFRA* mutations to tyrosine kinase inhibitors [12, 18]

| Подтип ГИСО GIST subtype | Мутации Mutations | Частота, % Frequency, % | Локализация Location | Чувствительность Sensitivity | | | |
|-----------------------------|--|----------------------------|---|---|---|---|---|
| | | | | Иматиниб, 1-я линия Imatinib, 1 st line | Сунитиниб, 2-я линия Sunitinib, 2 nd line | Регорафениб, 3-я линия Regorafenib, 3 rd line | Рипретиниб, 4-я линия Ripretinib, 4 th line |
| KIT (65–75 %) | <i>KIT</i> , 9-й экзон <i>KIT</i> , exon 9 | 10 | Тонкая и толстая кишка Small and large bowel | +/- | + | + | + |
| | <i>KIT</i> , 11-й экзон <i>KIT</i> , exon 11 | 60–65 | ЖКТ GIT | + | + | + | + |
| | <i>KIT</i> , 13-й экзон <i>KIT</i> , exon 13 | 1 | ЖКТ GIT | – | + | – | + |
| | <i>KIT</i> , 17-й экзон <i>KIT</i> , exon 17 | 1 | ЖКТ GIT | – | – | + | + |
| PDGFRA (10–15 %) | <i>PDGFRA</i> , 12-й экзон <i>PDGFRA</i> , exon 12 | 1–2 | Желудок Stomach | + | + | + | + |
| | <i>PDGFRA</i> , 14-й экзон <i>PDGFRA</i> , exon 14 | <1 | Желудок Stomach | * | * | * | * |
| | <i>PDGFRA</i> , 18-й экзон, (p.D842V) <i>PDGFRA</i> , exon 18, (p.D842V) | 5–8 | Желудок Stomach | – | – | – | – |
| | <i>PDGFRA</i> , 18-й экзон; все, кроме (p.D842V) <i>PDGFRA</i> , exon 18; non-D842V | 3–5 | Желудок Stomach | + | + | * | * |

*Нет данных.

*No data.

Примечание. ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

Note. GIT – gastrointestinal tract.

включает изучение клеточной иммунотерапии цитокин-индуцированными лимфоцитами-киллерами (CIK) и интерферонами. На 11 первичных клеточных линиях ГИСО «дикого типа» было показано, что полученные от пациентов CIK способны интенсивно уничтожать *in vitro* клетки ГИСО «дикого типа», резистентные как к иматинибу, так и к сунитинибу [95]. Авторы считают, что IFN может оказывать прямое цитотоксическое действие на ГИСО. Результаты изучения цитотоксического действия CIK и IFN могут послужить для разработки новой стратегии терапии ГИСО, поскольку эффективные терапевтические средства для ГИСО *KIT*/*PDGFRA* WT пока отсутствуют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы достижения молекулярной онкологии значительно дополнили наши знания о ГИСО, активно изучается гетерогенная группа ГИСО «дикого

типа». Были определены генетические и эпигенетические изменения, молекулярные нарушения, характерные для отдельных подтипов ГИСО. Расширены знания о SDH-дефицитных опухолях, в частности о ГИСО у детей и молодых женщин. Внедрение иммуногистохимических методов, позволяющих выявлять ГИСО с дефицитом SDHB и SDHA, облегчает скрининг и дальнейшую стратегию молекулярного тестирования. Четко охарактеризованы SDH-компетентные ГИСО «дикого типа» с нарушениями генов MAPK-сигнального пути. Получены новые данные о группе ГИСО *KIT*/*PDGFRA*/*SDH*/*RAS*-P WT: о роли FGFR-сигнального пути в этих опухолях, с помощью NGS выявлены химерные гены, а также мутации в целом ряде генов. Определение молекулярных нарушений необходимо для выбора терапии, однако эффективные терапевтические средства для ГИСО «дикого типа» пока отсутствуют. Поэтому сегодня для решения про-

Таблица 2. Характеристика подтипов гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) *KIT/PDGFR* WTTable 2. Characteristics of *KIT/PDGFR* WT gastrointestinal stromal tumor (GIST) subtypes

| ГИСО <i>KIT/PDGFR</i> WT GIST <i>KIT/PDGFR</i> WT | Частота, % Frequency, % | Локализация Location | Генетические нарушения Genetic alterations | Особенности Features |
|--|----------------------------|--|--|--|
| SDH-дефицитные – резистентны к иматинибу SDH deficient – imatinib resistant | | | | |
| Синдром Карни–Стратакиса, триада Карни, спорадические ГИСО Carney–Stratakis syndrome (CSS), Carney triad, sporadic GIST | 20–40 | Желудок Stomach | <i>SDHB/C/D</i> -мутации в СКК (20 %), <i>SDHA/B</i> -мутации в триаде Карни и спорадических ГИСО (30 %), эпимутация <i>SDHC</i> в триаде Карни и спорадических ГИСО (30–50 %) <i>SDHB/C/D</i> mutations in CSS (20 %), <i>SDHA/B</i> mutations in Carney triad and sporadic GIST (30 %), <i>SDHC</i> epimutations in Carney triad and sporadic GIST only (30–50 %) | Пациенты – дети и молодые люди, чаще женского пола. Вялотекущее заболевание, метастазирует в лимфатические узлы. ГИСО отвечают на сунитиниб (особенно дети) и регорафениб. Показатели общей выживаемости выше, чем при SDH-компетентных ГИСО или с мутациями <i>KIT/PDGFR</i> Patients – children and young adults, mostly female. Indolent disease with lymph node metastasis. GIST responsive to sunitinib, regorafenib. Overall survival is higher than in patients with SDH-competent GIST or with <i>KIT/PDGFR</i> mutations |
| SDH-компетентные – резистентны к иматинибу SDH competent – imatinib resistant | | | | |
| NF1-ассоциированные NF1 associated | 5 | Тонкая кишка Small intestine | <i>NF1</i> | Опухоли агрессивны, высокая экспрессия CD117 и CD34 Aggressive tumors, high CD117 and CD34 expression |
| BRAF | 4–13 | Желудок, тонкая кишка Stomach, small intestine | BRAF V600E | Ингибиторы BRAF + MEK, дабрафениб, регорафениб. Хорошие показатели выживаемости пациентов BRAF + MEK inhibitors, dabrafenib, regorafenib. Good survival of patients |
| RAS | <1 | | <i>KRAS, HRAS, NRAS</i> | Резистентны к иматинибу Imatinib resistant |
| <i>KIT/PDGFR/SDH/RAS-P</i> WT («четырежды дикий тип») <i>KIT/PDGFR/SDH/RAS-P</i> WT (“quadruple wild type”) | ~50 | Весь желудочно-кишечный тракт The entire gastrointestinal tract | Слитные гены: <i>ETV6-NTRK3, TRIM4-BRAF, FGFR1-TACC1, MARK2-PPF1A1, SPRED2-NELFCD</i> . Fusion genes: <i>ETV6-NTRK3, TRIM4-BRAF, FGFR1-TACC1, MARK2-PPF1A1, SPRED2-NELFCD</i> Мутации: <i>TP53, MEN1, MAX, FGFR1, CHD4, CTDNN2, CBL, ARID1A, BCOR, ATRX, NF1, MSH2, PMS1, DICER, VHL, APC, RB1</i> Mutations: <i>TP53, MEN1, MAX, FGFR1, CHD4, CTDNN2, CBL, ARID1A, BCOR, ATRX, NF1, MSH2, PMS1, DICER, VHL, APC, RB1</i> | Химерные гены, мутации различных генов, активация FGFR-пути Fusion genes, different gene mutations, activation of FGFR signaling |

Примечание. SDH – сукцинатдегидрогеназа; СКК – Синдром Карни–Стратакиса; NF1 – нейрофиброматоз 1-го типа; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов.

Note. SDH – succinate dehydrogenase; CSS – Carney–Stratakis syndrome; NF1 – neurofibromatosis type 1; FGFR – fibroblast growth factor receptor.

блемы помимо тестирования ГИСО на мутации *KIT/PDGFR* необходимо внедрять комплексное молекулярное тестирование, включающее иммуногистохимический анализ и NGS для выявления клинически

значимых мишеней. Очевидно, что в будущем особое внимание будет уделено новым стратегиям терапии ГИСО и, в частности, возможному применению им-

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Miettinen M., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterol Clin North Am* 2013;42(2):399–415. DOI: 10.1016/j.gtc.2013.01.001
- Joensuu H., Hohenberger P., Corless C.L. Gastrointestinal stromal tumor. *Lancet* 2013;382(9896):973–83. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60106-3
- Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей. В кн.: Молекулярный канцерогенез. М.: АБВ-пресс, 2016. С. 300–321. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V. Genetic features and markers of gastrointestinal stromal tumors. In: *Molecular carcinogenesis*. Moscow, ABV-press, 2016. Pp. 300–321. (In Russ.).
- Мазуренко Н.Н., Югай В.В., Цыганова И.В. и др. Молекулярная гетерогенность и анализ отдаленной выживаемости пациентов с гастроинтестинальными стромальными опухолями. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(2):43–57. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-43-57
Mazurenko N.N., Yugai V.V., Tsyganova I.V. Molecular heterogeneity and analysis of the long-term survival of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):43–57. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-43-57
- Blay J.Y., Kang Y.K., Nishida T., von Mehren M. Gastrointestinal stromal tumors. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7(1):22. DOI: 10.1038/s41572-021-00254-5
- Søreide K., Sandvik O.M., Søreide J.A. et al. Global epidemiology of gastrointestinal stromal tumors (GIST): a systematic review of population-based cohort studies. *Cancer Epidemiol* 2016;40:39–46. DOI: 10.1016/j.canep.2015.10.031
- Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279(5350):577–80. DOI: 10.1126/science.279.5350.577
- Hirota S., Ohashi A., Nishida T. et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125(3):660–7. DOI: 10.1016/s0016-5085(03)01046-1.
- Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A. et al. *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299(5607):708–10. DOI: 10.1126/science.1079666
- Joensuu H., Roberts P.J., Sarlomo-Rikala M. et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001;344(14):1052–6. DOI: 10.1056/NEJM200104053441404
- Ding H., Yu X., Yu Y. et al. Clinical significance of the molecular heterogeneity of gastrointestinal stromal tumors and related research: a systematic review. *Oncol Rep* 2020;43(3):751–64. DOI: 10.3892/or.2020.7470
- Huang W.K., Wu C.E., Wang S.Y. et al. Systemic therapy for gastrointestinal stromal tumor: current standards and emerging challenges. *Curr Treat Options Oncol* 2022;23(9):1303–19. DOI: 10.1007/s11864-022-00996-8
- Nannini M., Biasco G., Astolfi A., Pantaleo M.A. An overview on molecular biology of *KIT/PDGFR* wild type (WT) gastrointestinal stromal tumors (GIST). *J Med Genet* 2013;50(10):653–61. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-101695
- Boikos S.A., Stratakis C.A. The genetic landscape of gastrointestinal stromal tumor lacking *KIT* and *PDGFRA* mutations. *Endocrine* 2014;47(2):401–8. DOI: 10.1007/s12020-014-0346-3
- Wada R., Arai H., Kure S. et al. “Wild type” GIST: clinicopathological features and clinical practice. *Pathol Int* 2016;66(8):431–7. DOI: 10.1111/pin.12431
- Boikos S.A., Pappo A.S., Killian J.K. et al. Molecular subtypes of *KIT/PDGFR* wild-type gastrointestinal stromal tumors: a report from the National Institutes of Health Gastrointestinal Stromal Tumor Clinic. *JAMA Oncol* 2016;2(7):922–8. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0256
- Andrzejewska M., Czarny J., Derwich K. Latest advances in the management of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Cancers (Basel)* 2022;14(20):4989. DOI: 10.3390/cancers14204989
- Wu C.E., Tzen C.Y., Wang S.Y., Yeh C.N. Clinical diagnosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST): from the molecular genetic point of view. *Cancers (Basel)* 2019;11(5):679. DOI: 10.3390/cancers11050679
- Rutter J., Winge D.R., Schiffman J.D. Succinate dehydrogenase – assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 2010;10(4):393–401. DOI: 10.1016/j.mito.2010.03.001
- Niinumata T., Suzuki H., Sugai T. Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2018;3:2. DOI: 10.21037/tgh.2018.01.02
- Janeway K.A., Kim S.Y., Lodish M. et al. Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking *KIT* and *PDGFRA* mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(1):314–8. DOI: 10.1073/pnas.1009199108.
- Boikos S.A., Xekouki P., Fumagalli E. et al. Carney triad can be (rarely) associated with germline succinate dehydrogenase defects. *Eur J Hum Genet* 2016;24(4):569–73. DOI: 10.1038/ejhg.2015.142
- Chou A., Chen J., Clarkson A. et al. Succinate dehydrogenase-deficient GISTs are characterized by IGF1R overexpression. *Mod Pathol* 2012;25(9):1307–13. DOI: 10.1038/modpathol.2012.77
- Mason E.F., Hornick J.L. Succinate dehydrogenase deficiency is associated with decreased 5-hydroxymethyl cytosine production in gastrointestinal stromal tumors: implications for mechanisms of tumorigenesis. *Mod Pathol* 2013;26(11):1492–7. DOI: 10.1038/modpathol.2013.86
- Schipani A., Nannini M., Astolfi A., Pantaleo M.A. *SDHA* germline mutations in SDH-deficient GISTs: a current update. *Genes (Basel)* 2023;14(3):646. DOI: 10.3390/genes14030646
- Carney J.A. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney Triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 1999;74(6):543–52. DOI: 10.4065/74.6.543
- Zhang L., Smyrk T.C., Young W.F.Jr. et al. Gastric stromal tumors in Carney triad are different clinically, pathologically, and behaviorally from sporadic gastric gastrointestinal stromal tumors: findings in 104 cases. *Am J Surg Pathol* 2010;34(1):53–64. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181c20f4f
- Carney J.A., Stratakis C.A. Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma: a new syndrome distinct from the Carney triad. *Am J Med Genet* 2002;108(2):132–9. DOI: 10.1002/ajmg.10235
- Pasini B., McWhinney S.R., Bei T. et al. Clinical and molecular genetics of patients with the Carney–Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet* 2008;16(1):79–88. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201904
- Gaal J., Stratakis C.A., Carney J.A. et al. SDHB immunohistochemistry: a useful tool in the diagnosis of Carney–Stratakis and Carney triad gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2011;24(1):147–51. DOI: 10.1038/modpathol.2010.185
- Югай В.В., Никулин М.П., Козлов Н.А. и др. Клинико-морфологические характеристики пациентов с гастроинтестинальной стромальной опухолью с дефицитом сукцинатдегидрогеназы. *Вопросы онкологии* 2022;68(5):614–21. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-614-621
- Yugai V.V., Nikulin M.P., Kozlov N.A. et al. Clinical and morphological characteristics of patients of gastrointestinal stromal tumor with deficiency of succinate dehydrogenase. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2022;68(5):614–21. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-614-621
- Dwight T., Benn D.E., Clarkson A. et al. Loss of SDHA expression identifies SDHA mutations in succinate dehydrogenase-deficient gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2013;37(2):226–33. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182671155
- Miettinen M., Killian J.K., Wang Z.F. et al. Immunohistochemical loss of succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) signals SDHA germline mutation. *Am J Surg Pathol* 2013;37(2):234–40. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182671178

34. Pantaleo M.A., Lolli C., Nannini M. et al. Good survival outcome of metastatic SDH-deficient gastrointestinal stromal tumors harboring SDHA mutations. *Genet Med* 2015;17(5):391–5. DOI: 10.1038/gim.2014.115
35. von Mehren M., George S., Heinrich M.C. et al. Linsitinib (OSI-906) for the treatment of adult and pediatric wild-type gastrointestinal stromal tumors, a SARC phase II study. *Clin Cancer Res* 2020;26(8):1837–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1069
36. Haller F., Moskalev E.A., Faucz F.R. et al. Aberrant DNA hypermethylation of SDHC: a novel mechanism of tumor development in Carney triad. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(4):567–77. DOI: 10.1530/ERC-14-0254
37. Killian J.K., Miettinen M., Walker R.L. et al. Recurrent epimutation of SDHC in gastrointestinal stromal tumors. *Sci Transl Med* 2014;6(268):268ra177. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009961
38. Agaram N.P., Wong G.C., Guo T. et al. Novel V600E BRAF mutations in imatinib-naïve and imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(10):853–9. DOI: 10.1002/gcc.20589
39. Agaimy A., Terracciano L.M., Dirnhofer S. et al. V600E BRAF mutations are alternative early molecular events in a subset of *KIT/PDGFR* wild-type gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Pathol* 2009;62(7):613–6. DOI: 10.1136/jcp.2009.064550
40. Huss S., Pasternack H., Ihle M.A. et al. Clinicopathological and molecular features of a large cohort of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and review of the literature: BRAF mutations in *KIT/PDGFR* wild-type GISTs are rare events. *Hum Pathol* 2017;62:206–14. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.01.005
41. Miranda C., Nucifora M., Molinari F. et al. KRAS and BRAF mutations predict primary resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18(6):1769–76. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2230
42. Franck C., Rosania R., Franke S. et al. The BRAF status may predict response to sorafenib in gastrointestinal stromal tumors resistant to imatinib, sunitinib, and regorafenib: case series and review of the literature. *Digestion* 2019;99(2):179–84. DOI: 10.1159/000490886
43. Falchook G.S., Trent J.C., Heinrich M.C. et al. BRAF mutant gastrointestinal stromal tumor: first report of regression with BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) and whole exomic sequencing for analysis of acquired resistance. *Oncotarget* 2013;4(2):310–5. DOI: 10.18632/oncotarget.864
44. Crona D.J., Keisler M.D., Walko C.M. Regorafenib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor for colorectal cancer and gastrointestinal stromal tumors. *Ann Pharmacother* 2013;47(12):1685–96. DOI: 10.1177/1060028013509792
45. Rossi S., Sbaraglia M., Dell'Orto M.C. et al. Concomitant *KIT/BRAF* and *PDGFRA/BRAF* mutations are rare events in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget* 2016;7(21):30109–18. DOI: 10.18632/oncotarget.8768
46. Guo J., Ge Q., Yang F. et al. Small gastric stromal tumors: an underestimated risk. *Cancers (Basel)* 2022;14(23):6008. DOI: 10.3390/cancers14236008
47. Lasota J., Xi L., Coates T. et al. No KRAS mutations found in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): molecular genetic study of 514 cases. *Mod Pathol* 2013;26(11):1488–91. DOI: 10.1038/modpathol.2013.89
48. Antonescu C.R., Romeo S., Zhang L. et al. Dedifferentiation in gastrointestinal stromal tumor to an anaplastic KIT-negative phenotype: a diagnostic pitfall: morphologic and molecular characterization of 8 cases occurring either *de novo* or after imatinib therapy. *Am J Surg Pathol* 2013;37(3):385–92. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31826c1761
49. Serrano C., Wang Y., Mariño-Enríquez A. et al. *KRAS* and *KIT* gatekeeper mutations confer polyclonal primary imatinib resistance in GI stromal tumors: relevance of concomitant phosphatidylinositol 3-kinase/AKT dysregulation. *J Clin Oncol* 2015;33(22):e93–6. DOI: 10.1200/JCO.2013.48.7488
50. Hechtman J.F., Zehir A., Mitchell T. et al. Novel oncogene and tumor suppressor mutations in *KIT* and *PDGFRA* wild type gastrointestinal stromal tumors revealed by next generation sequencing. *Genes Chromosomes Cancer* 2015;54(3):177–84. DOI: 10.1002/gcc.22230
51. Chen Q., Li R., Zhang Z.G. et al. Oncogene mutational analysis in Chinese gastrointestinal stromal tumor patients. *Onco Targets Ther* 2018;11:2279–86. DOI: 10.2147/OTT.S155214
52. Miettinen M., Fetsch J.F., Sobin L.H., Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 2006;30(1):90–6. DOI: 10.1097/01.pas.0000176433.81079.bd
53. Mussi C., Schildhaus H.U., Gronchi A. et al. Therapeutic consequences from molecular biology for gastrointestinal stromal tumor patients affected by neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res* 2008;14(14):4550–5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0086
54. Gutmann D.H., Ferner R.E., Listernick R.H. et al. Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17004. DOI: 10.1038/nrdp.2017.4. PMID: 28230061
55. Gasparotto D., Rossi S., Polano M. et al. Quadruple-negative GIST is a sentinel for unrecognized neurofibromatosis type 1 syndrome. *Clin Cancer Res* 2017;23(1):273–82. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0152
56. Belinsky M.G., Rink L., Cai K.Q. et al. Somatic loss of function mutations in neurofibromin 1 and MYC associated factor X genes identified by exome-wide sequencing in a wild-type GIST case. *BMC Cancer* 2015;15:887. DOI: 10.1186/s12885-015-1872-y
57. Wu J., Zhou H., Yi X. et al. Targeted Deep sequencing reveals unrecognized KIT mutation coexistent with NF1 deficiency in GISTs. *Cancer Manag Res* 2021;13:297–306. DOI: 10.2147/CMAR.S280174
58. Shi S.S., Wu N., He Y. et al. *EGFR* gene mutation in gastrointestinal stromal tumors. *Histopathology* 2017;71(4):553–61. DOI: 10.1111/his.13251
59. Lasota J., Felisiak-Golabek A., Wasag B. et al. Frequency and clinicopathologic profile of *PIK3CA* mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Mod Pathol* 2016;29(3):275–82. DOI: 10.1038/modpathol.2015.160
60. Quattrone A., Wozniak A., Dewaele B. et al. Frequent mono-allelic loss associated with deficient PTEN expression in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2014;27(11):1510–20. DOI: 10.1038/modpathol.2014.53
61. Lasota J., Kowalik A., Felisiak-Golabek A. et al. New mechanisms of mTOR pathway activation in KIT-mutant malignant GISTs. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2019;27(1):54–8. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000541
62. Pantaleo M.A., Nannini M., Corless C.L., Heinrich M.C. Quadruple wild-type (WT) GIST: defining the subset of GIST that lacks abnormalities of KIT, PDGFRA, SDH, or RAS signaling pathways. *Cancer Med* 2015;4(1):101–3. DOI: 10.1002/cam4.325
63. Shi E., Chmielecki J., Tang C.M. et al. FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in “Wild-Type” gastrointestinal stromal tumors. *J Transl Med* 2016;14(1):339. DOI: 10.1186/s12967-016-1075-6
64. Urbini M., Indio V., Tarantino G. et al. Gain of FGF4 is a frequent event in *KIT/PDGFR/SDH/RAS-PWT* GIST. *Genes Chromosomes Cancer* 2019;58(9):636–42. DOI: 10.1002/gcc.22753
65. Astolfi A., Pantaleo M.A., Indio V. et al. The Emerging role of the FGF/FGFR pathway in gastrointestinal stromal tumor. *Int J Mol Sci* 2020;21(9):3313. DOI: 10.3390/ijms21093313
66. Napolitano A., Ostler A.E., Jones R.L., Huang P.H. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) signaling in GIST and soft tissue sarcomas. *Cells* 2021;10(6):1533. DOI: 10.3390/cells10061533
67. Pantaleo M.A., Urbini M., Indio V. et al. Genome-wide analysis identifies MEN1 and MAX mutations and a neuroendocrine-like molecular heterogeneity in Quadruple WT GIST. *Mol Cancer Res* 2017;15(5):553–62. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0376
68. Flavahan W.A., Drier Y., Johnstone S.E. et al. Altered chromosomal topology drives oncogenic programs in SDH-deficient GISTs. *Nature* 2019;575(7781):229–33. DOI: 10.1038/s41586-019-1668-3
69. Javidi-Sharifi N., Traer E., Martinez J. et al. Crosstalk between KIT and FGFR3 promotes gastrointestinal stromal tumor cell growth and drug resistance. *Cancer Res* 2015;75(5):880–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0573
70. Li F., Huynh H., Li X. et al. FGFR-mediated reactivation of MAPK signaling attenuates antitumor effects of imatinib in gastrointestinal

- stromal tumors. *Cancer Discov* 2015;5(4):438–51. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0763
71. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance. *Molecules* 2017;22(12):2152. DOI: 10.3390/molecules22122152
 72. Boichuk S., Galembikova A., Mikheeva E. et al. Inhibition of FGF2-mediated signaling in GIST-promising approach for overcoming resistance to imatinib. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1674. DOI: 10.3390/cancers12061674
 73. Brenca M., Rossi S., Polano M. et al. Transcriptome sequencing identifies *ETV6-NTRK3* as a gene fusion involved in GIST. *J Pathol* 2016;238(4):543–9. DOI: 10.1002/path.4677
 74. Kheder E.S., Hong D.S. Emerging targeted therapy for tumors with NTRK fusion proteins. *Clin Cancer Res* 2018;24(23):5807–14. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1156
 75. Demetri G.D., Antonescu C.R., Bjerkehagen B. et al. Diagnosis and management of tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion sarcomas: expert recommendations from the World Sarcoma Network. *Ann Oncol* 2020;31(11):1506–17. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2232
 76. Brčić I., Godschachner T.M., Bergovec M. et al. Broadening the spectrum of *NTRK* rearranged mesenchymal tumors and usefulness of pan-TRK immunohistochemistry for identification of *NTRK* fusions. *Mod Pathol* 2021;34(2):396–407. DOI: 10.1038/s41379-020-00657-x
 77. Castillon M., Kammerer-Jacquet S.F., Cariou M. et al. Fluorescent *in situ* hybridization must be preferred to pan-TRK immunohistochemistry to diagnose *NTRK3*-rearranged gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2021;29(8):626–34. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000933
 78. Drilon A. TRK inhibitors in TRK fusion-positive cancers. *Ann Oncol* 2019;30(8):viii23–30. DOI: 10.1093/annonc/mdz282
 79. Hong D.S., DuBois S.G., Kummar S. et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumors: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol* 2020;21(4):531–40. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30856-3
 80. Drilon A., Ou S.I., Cho B.C. et al. Repotrectinib (TPX-0005) is a next-generation ROS1/TRK/ALK inhibitor that potently inhibits ROS1/TRK/ALK solvent-front mutations. *Cancer Discov* 2018;8(10):1227–36. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0484
 81. Charo L.M., Burgoyne A.M., Fanta P.T. et al. A Novel *PRKAR1B-BRAF* fusion in gastrointestinal stromal tumor guides adjuvant treatment decision-making during pregnancy. *J Natl Compr Canc Netw* 2018;16(3):238–42. DOI: 10.6004/jncn.2017.7039
 82. Torrence D., Xie Z., Zhang L. et al. Gastrointestinal stromal tumors with *BRAF* gene fusions. A report of two cases showing low or absent KIT expression resulting in diagnostic pitfalls. *Genes Chromosomes Cancer* 2021;60(12):789–95. DOI: 10.1002/gcc.22991
 83. Vanden Bempt I., Vander Borgh S., Sciot R. et al. Comprehensive targeted next-generation sequencing approach in the molecular diagnosis of gastrointestinal stromal tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2021;60(4):239–49. DOI: 10.1002/gcc.22923
 84. Cho W.C., Shin Y.K., Na Y.S. et al. The role of novel fusion genes in human GIST cell lines derived from imatinib-resistant GIST patients: a therapeutic potential of fusion gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;529(3):699–706. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.05.174
 85. Kang G., Yun H., Sun C.H. et al. Integrated genomic analyses identify frequent gene fusion events and VHL inactivation in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget* 2016;7(6):6538–51. DOI: 10.18632/oncotarget.3731
 86. Wang S., Sun R.Z., Han Q. et al. Genomic study of chinese quadruple-negative GISTs using next-generation sequencing technology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2021;29(1):34–41. DOI: 10.1097/PAI.0000000000000842
 87. Debiec-Rychter M., Sciot R., Le Cesne A. et al. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Cancer* 2006;42(8):1093–103. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.01.030
 88. Corless C.L., Ballman K.V., Antonescu C.R. et al. Pathologic and molecular features correlate with long-term outcome after adjuvant therapy of resected primary GI stromal tumor: the ACOSOG Z9001 trial. *J Clin Oncol* 2014;32(15):1563–70. DOI: 10.1200/JCO.2013.51.2046
 89. Heinrich M.C., Maki R.G., Corless C.L. et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008;26(33):5352–59. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.7461
 90. Ben-Ami E., Barysaukas C.M., von Mehren M. et al. Long-term follow-up results of the multicenter phase II trial of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of standard tyrosine kinase inhibitor therapy. *Ann Oncol* 2016;27(9):1794–9. DOI: 10.1093/annonc/mdw2289
 91. Vallilas C., Sarantis P., Kyriazoglou A. et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): novel therapeutic strategies with immunotherapy and small molecules. *Int J Mol Sci* 2021;22(2):493. DOI: 10.3390/ijms22020493
 92. Бойчук С.В., Абдураева С.А., Копнин П.Б. Иммуноterapia гастроинтестинальных стромальных опухолей: состояние вопроса и перспективы. *Успехи молекулярной онкологии* 2023;10(2):17–29. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-17-29
 93. Boichuk S.V., Abduraeva S.A., Kopnin P. B. Immunotherapy of gastrointestinal stromal tumors: current view and future directions. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*. 2023;10(2):17–29. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-17-29
 94. Yamaguchi U., Nakayama R., Honda K. et al. Distinct gene expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4100–8. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.2331
 95. Bertucci F., Finetti P., Mamessier E. et al. PD-L1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. *Oncoimmunology* 2015;4(5):e1002729. DOI: 10.1080/2162402X.2014.1002729
 96. Fiorino E., Merlini A., D'Ambrosio L. et al. Integrated antitumor activities of cellular immunotherapy with CIK lymphocytes and interferons against *KIT/PDGFR* wild type GIST. *Int J Mol Sci* 2022;23(18):10368. DOI: 10.3390/ijms231810368

Вклад авторов

Н.Н. Мазуренко, В.В. Югай, И.В. Цыганова: анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

N.N. Mazurenko, V.V. Yugay, I.V. Tsyganova: data analysis, article writing, diting.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Н. Мазуренко / N.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0003-4767-6983>

В.В. Югай / V.V. Yugay: <https://orcid.org/0000-0001-6169-2723>

И.В. Цыганова / I.V. Tsyganova: <https://orcid.org/0000-0002-3388-7547>

Статья поступила: 26.09.2023. Принята к публикации: 20.11.2023.

Article submitted: 26.09.2023. Accepted for publication: 20.11.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-76-85>

Неструктурная роль цитокератинов при злокачественных новообразованиях

М.А. Болдышевская¹, Л.А. Таширева¹, Е.С. Андриюхова¹, Т.А. Дронова¹, С.В. Вторушин^{1,2}, В.М. Перельмутер¹

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

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

Контакты: Любовь Александровна Таширева tashireva@oncology.tomsk.ru

Цитокератины (ЦК) являются промежуточными филаментами цитоскелета эпителиальных клеток и обеспечивают специфическую структуру и морфологию клеток, в частности апико-базальную поляризацию клеток. Отмечается определенная специфика ассоциации ЦК с разными типами эпителия. Гетерогенность ЦК, которая сопряжена с анатомической локализацией, особенно выражена в железистом эпителии. Относительная специфичность ЦК в эпителии разной локализации сохраняется в значительной степени и при его злокачественной трансформации. Благодаря этому определение спектра ЦК в опухолевых клетках является довольно эффективным инструментом нозологической диагностики карцином. Однако функция ЦК не исчерпывается обеспечением структуры клетки. Наличие/отсутствие ЦК и их количество обусловлены важнейшими процессами в нормальных и опухолевых клетках: движением/инвазией, апоптозом, пролиферацией, эпителиально-мезенхимальным переходом. Возникает вопрос: «Первична ли инициация перечисленных процессов, и тогда изменения ЦК вторичны и «пассивны», или в каких-то процессах изменения ЦК могут играть роль триггера?» Ответ на него не только имеет фундаментальное значение, но и важен для поиска способов управления указанными процессами путем воздействия на ЦК.

Ключевые слова: цитокератины, злокачественные новообразования, эпителиально-мезенхимальный переход, апоптоз

Для цитирования: Болдышевская М.А., Таширева Л.А., Андриюхова Е.С. и др. Неструктурная роль цитокератинов при злокачественных новообразованиях. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):76–85. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-76-85>

Non-structural role of cytokeratins in malignant neoplasms

M.A. Boldyshevskaya¹, L.A. Tashireva¹, E.S. Andryukhova¹, T.A. Dronova¹, S.V. Vtorushin^{1,2}, V.M. Perelmuter¹

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

²Siberian State Medical University; 2 Moskovsky Trakt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Liubov Aleksandrovna Tashireva tashireva@oncology.tomsk.ru

Cytokeratins (CKs) are well studied as intermediate filaments of the cytoskeleton of epithelial cells, providing specific cell structure and morphology, in particular, apico-basal cell polarization. Meanwhile, a certain specificity of the association of CK with different types of epithelia is noted. CK heterogeneity in the glandular epithelium is particularly pronounced and is associated with anatomical localization. The relative specificity of CKs in epithelium of different localization is preserved to a great extent in carcinomas originating from this epithelium as well. Due to this fact the determination of CK spectrum in tumor cells is quite an effective tool for nosological diagnostics of carcinomas. However, the function of CKs is not limited to providing the cell structure. The presence and amount of CK changes during the most important processes in normal and tumor cells: movement/invasion, apoptosis, proliferation, epithelial-mesenchymal plasticity.

A question arises: Is initiation of the above-listed processes happens first, and therefore CK changes are secondary and «passive», or in some processes CK changes can play a role of a trigger? Knowing the answer to this question is not only of fundamental importance, but is also important for finding ways to control the above processes by influencing the CKs.

Keywords: cytokeratins, malignant neoplasms, epithelial-mesenchymal transition, apoptosis

For citation: Boldyshevskaya M.A., Tashireva L.A., Andryukhova E.S. et al. Non-structural role of cytokeratins in malignant neoplasms. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):76–85. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-76-85>

ВВЕДЕНИЕ

Цитокератины (ЦК) хорошо изучены как промежуточные филаменты цитоскелета эпителиальных клеток, обеспечивающих специфическую структуру и морфологию клеток. Это касается прежде всего апико-базальной поляризации клеток. Потеря данного признака является одним из наиболее ярких цитологических проявлений ЭМП. Очевидно, что эти функции универсальны для разных по молекулярным характеристикам ЦК. Между тем отмечается определенная специфика ассоциации ЦК с различными типами эпителия. Особенно выражена гетерогенность ЦК в железистом эпителии, которая сопряжена с анатомической локализацией. Относительная специфичность ЦК в эпителии разной локализации сохраняется в значительной степени и в карциномах, происшедших из этого эпителия. Благодаря этому определение спектра ЦК в опухолевых клетках является довольно эффективным инструментом нозологической диагностики карцином. Однако функция ЦК не исчерпывается обеспечением структуры клетки. Наличие/отсутствие и количество ЦК сопряжены с функционированием важнейших процессов в нормальных и опухолевых клетках: движением/инвазией, апоптозом, пролиферацией, ЭМП. В данном обзоре рассматривается участие ЦК в важнейших механизмах прогрессии опухоли и обсуждается взаимосвязь процессов утраты/появления ЦК с некоторыми свойствами, обеспечивающими прогрессию опухоли.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКЕРАТИНОВ

Цитокератины представляют собой белки промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток [1]. Основной их функцией считается обеспечение структурной целостности клеток. Цитокератины рассматриваются в качестве диагностических маркеров [2], в том числе при жидкостной биопсии [3]. Описано значение ЦК как регуляторов апико-базальной поляризации, размера клеток и позиционирования органелл [4]. Однако в настоящее время появляется все больше данных о других функциях ЦК, в том числе об их участии в механизмах опухолевой прогрессии.

Промежуточные филаменты возникли во время ранней эволюции Metazoa, чтобы обеспечить механическую поддержку плазматических мембран, контактирующих/взаимодействующих с другими клетками и внеклеточным матриксом. Гены ЦК составляют самое большое подмножество генов промежуточных филаментов [5]. Цитокератины кодируются 54 эволюционно консервативными генами (28 из них кодируют ЦК 1-го типа, 26 – ЦК 2-го типа).

Цитокератины 1-го типа, как правило, имеют небольшую молекулярную массу (40–56,5 кДа) и положительный общий заряд, тогда как ЦК 2-го типа больше (50–70 кДа) и имеют отрицательный или нейтральный заряд. Цитокератины человека подразделяются на эпителиальные ЦК, кодируемые 37 генами, и ЦК волос, кодируемые 17 генами. Цитокератинам присваивается номер, например, эпителиальные ЦК 1-го типа имеют номера 9–28, а эпителиальные ЦК 2-го типа – 1–8 и 71–80. Различают простые, барьерные и структурные ЦК. Простые ЦК экспрессируются в эмбриональном и однослойном эпителии, включая эпителий кишечника, гепатоциты и потовые железы, а барьерные ЦК – в многослойном плоском эпителии, например в коже, слизистой оболочке полости рта, пищеводе [1]. М. Но и соавт. [5] провели биоинформатический анализ и пришли к выводу, что ЦК18 1-го типа (ген *KRT18*) наиболее близко напоминает предкового предшественника других ЦК 1-го типа, а ЦК18 2-го типа (ген *KRT8*) – предкового предшественника всех ЦК 2-го типа.

Экспрессия генов ЦК регулируется цитокинами и факторами роста через различные транскрипционные факторы. Например, эпидермальный фактор роста индуцирует экспрессию связанных с воспалением и пролиферацией ЦК6 и ЦК16 на уровне транскрипции, интерферон γ индуцирует активность промотора ЦК17 через транскрипционный фактор преобразователей сигналов и активаторов транскрипции 1 [6], а фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor α , TNF- α) индуцирует активность промотора ЦК6 через транскрипционный ядерный фактор каппа-би (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) [7].

По своей структуре ЦК схожи с другими промежуточными филаментами. Они имеют высококонсервативный центральный α -спиральный стержневой домен и переменные неспиральные N- и C-концевые домены головы и хвоста [4]. Цитокератины 1-го и 2-го типов строго взаимозависимы, у каждого из них существует свой димерный партнер. Так, например, ЦК5 образует гетеродимеры с ЦК14, а ЦК6 – с ЦК16 [8]. Кластеризация паттернов генной экспрессии выявила сходство в тканеспецифических паттернах экспрессии для ранее описанных цитокератиновых пар (т.е. белков ЦК1/ЦК10, ЦК8/ЦК18, ЦК5/ЦК14, ЦК6/ЦК16 и ЦК6/ЦК17) [8]. Цитокератиновые сборки более стабильны, чем отдельные мономеры ЦК, однако они способны реконструироваться в зависимости от условий, в которых находится клетка. Это свойство осуществляется через взаимодействие с другими белками, в частности посредством их тесной регуляции с помощью сайт-специфического фосфорилирования [8].

Гетеродимеры ЦК образуются не на периферии клеток, а недалеко от мест трансляции их матричной РНК (мРНК). Этот процесс, по-видимому, требует участия шаперонов, поскольку α -спирали в водных растворах агрегируют. Собранные из димеров тетрамеры могут перемещаться в цитоплазме на периферию клеток и там полимеризоваться в короткие филаменты. Единичные филаменты представляют собой «бочонки», состоящие из 8 тетрамеров, которые связываются между собой конец к концу.

В исследованиях *in vitro* было показано, как происходит сборка цитокератиновых филаментов. Этот процесс начинается на периферии клетки с образования гетеродимеров, которые представляют собой мономеры 1-го и 2-го типов. Сборка осуществляется за счет объединения соответствующих стержневых доменов в α -спиральную конформацию coiled-coil (конформацию спиральной катушки). Гетеродимеры взаимодействуют вдоль своих боковых поверхностей с осевым сдвигом и антипараллельной ориентацией, создавая структурно аполярные тетрамеры, которые, в свою очередь, взаимодействуют и образуют аполярные волокна шириной 10 нм [9]. В процессе сборки предшественники небольшого размера, которые появляются на периферии клетки, удлиняются и интегрируются в сеть, которая непрерывно стремится к ядру клетки. Когда пучки цитокератиновых нитей накапливаются в перинуклеарной области, происходит их стабилизация за счет дисульфидных связей. Таким образом, цитокератиновые филаменты, с одной стороны, связаны с белками клеточной мембраны, а с другой, — с ядром клетки и могут действовать как преобразователи сигналов, передавая информацию из внеклеточной среды в ядро. Существуют белки линкеры-плакины, обеспечивающие связь промежуточных филаментов с другими структурами цитоскелета и белками межклеточных контактов [10]. Изменения в сборке цитокератиновых филаментов могут повлиять на их правильное взаимодействие с мембранными белками, что, в свою очередь, способствует нарушению передачи сигналов. Данные филаменты могут подвергаться деградации с помощью убиквитинирования и разборке на повторно используемые субъединицы [11].

Функции ЦК и их реорганизация при стрессе регулируются посттрансляционными модификациями и белками, ассоциированными с ЦК. Цитокератины претерпевают несколько посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, гликозилирование, убиквитинирование, ацетилирование и др. Фосфорилирование ЦК наиболее хорошо изучено и считается основным механизмом регуляции среди различных типов модификаций белков, поскольку модулирует внутренние свойства ЦК, такие как растворимость, изменение конформации и структуры филаментов. Сайты фосфорилирования представляют собой остатки Ser/Thr, расположенные в головном и хвостовом доменах ЦК. Фосфорилирование ЦК мо-

жет нарушать связь между тетрамерами и вызывать деполимеризацию филаментов. Показано, что процесс фосфорилирования — дефосфорилирования обеспечивает динамику промежуточных филаментов. Существуют данные, свидетельствующие о том, что реорганизация ЦК способна обеспечивать устойчивость клеток к апоптозу [12]. Механизмы этого явления в настоящее время еще не изучены в должной мере.

В процессе развития злокачественных новообразований клетки способны изменять свой цитокератиновый состав. Одни ЦК, присутствующие в норме, могут исчезать, а другие, не свойственные данным клеткам, наоборот, появляться. Так, например, эпителиальные клетки толстого кишечника в норме и при развитии злокачественных новообразований экспрессируют ЦК20, но не экспрессируют ЦК7. Однако в ряде исследований описаны случаи экспрессии ЦК7 в клетках колоректальной карциномы. По данным ряда исследований, наличие экспрессии ЦК7 является сильным отрицательным прогностическим индикатором, связанным с худшими показателями выживаемости и более агрессивным поведением опухоли [13]. Наиболее полноценно паттерны экспрессии ЦК7 и ЦК20 при опухолях описаны в работе D. Dum и соавт. [14], в которой с помощью тканевых микроматриц, содержащих 15424 образца из 120 различных типов и подтипов опухолей и 608 образцов из 76 различных типов нормальной ткани, с помощью иммуногистохимического исследования была проанализирована экспрессия ЦК7 и ЦК20. С неблагоприятным исходом ассоциирована потеря ЦК7 при раке молочной железы (РМЖ), уротелиальной и почечно-клеточной карциномах, повышение экспрессии ЦК7 при high-grade серозном раке яичников и желудка и ЦК20 при уротелиальной карциноме [14].

Интересно, что некоторые ЦК могут появляться в опухолевых клетках, для которых их экспрессия не свойственна, что связано с прогнозом течения заболевания. Так, анализ базы данных Gene Expression Omnibus, включающей 31 первичную меланому и 73 метастатические меланомы, а также данных «Атласа ракового генома» (The Cancer Genome Atlas), содержащих 475 образцов меланомы (в том числе 104 первичных и 371 метастатический), показал, что высокие уровни транскрипции *KRT1/5/6/14/15/16/17* ассоциированы с низкими показателями общей выживаемости больных меланомой [15].

Таким образом, экспрессия некоторых ЦК в опухолевых клетках может как увеличиваться, так и снижаться. Оба эти явления способны влиять на прогрессию заболевания. Однако механизмы, вовлекаемые в эффекты ЦК при злокачественных новообразованиях, остаются не совсем ясными.

ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОКЕРАТИНОВ И АПОПТОЗ

Известно, что экспрессия ЦК может влиять на чувствительность к TNF- α -индуцированному

апоптозу. Экспериментально было показано, что потеря ЦК8/ЦК18 приводит к увеличению чувствительности клеток к такому апоптозу в 2 раза по сравнению с клетками, в которых наблюдается нормальная экспрессия данных ЦК. Это вызвано тем, что ЦК18 способен специфически связываться через свою N-концевую область с рецептором TNF- α типа 1. Данный рецептор ассоциирован с белком домена смерти, который взаимодействует с надсемейством рецепторов TNF- α и опосредует передачу сигналов запрограммированной гибели клеток и активацию NF- κ B. Цитоцератин 18 при взаимодействии с рецептором TNF- α типа 1 препятствует его связыванию с белком домена смерти, тем самым ослабляя TNF- α -индуцированный апоптоз в эпителиальных клетках [16].

Было показано, что в клетках линии РМЖ MDA-MB-231, устойчивых к TRAIL-индуцированному апоптозу (TRAIL-TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз), уровни ЦК8/ЦК18 были выше, чем в TRAIL-чувствительных клетках линий MCF7 и T47D. Вероятно, это связано с тем, что потеря ЦК8/ЦК18 способствует значительному увеличению белка DR5. Данный белок входит в многочисленное семейство рецепторов TNF- α и является мембранным рецептором для лиганда цитотоксичности TRAIL [17]. Потеря ЦК8/ЦК18 приводит к увеличению экспрессии DR5 на мембране, и это сенсбилизирует TRAIL-устойчивые линии клеток к индуцированному TRAIL апоптозу. Цитоцератины 8 и 18 физически взаимодействуют с рецептором DR5, регулируя передачу сигналов апоптоза, индуцированного TRAIL [18]. Таким образом, эти ЦК могут защищать опухолевые клетки от апоптоза, в частности при РМЖ.

Показано, что растворимая форма ЦК8 действует как фосфатная губка, ингибируя фосфокиназную активацию проапоптотических субстратов (c-Jun, Elk-1, c-Fos, Vim и Bad) и тем самым защищая клетки от апоптоза [19]. Также сообщалось, что внеклеточная сигнал-регулируемая киназа 1 участвует в фосфорилировании ЦК8 по Ser73 в опухолевых клетках линии A549 в ответ на агент, индуцирующий апоптоз, поскольку фосфорилирование блокировалось только ингибитором внеклеточной сигнал-регулируемой киназы [20]. Кроме того, известно, что увеличение изоформ фосфо-ЦК8 в клетках колоректальной карциномы связано с активацией пути рецептора эпидермального фактора роста и подавлением апоптоза [21].

В эксперименте *in vitro* показано, что сверхэкспрессия ЦК17 индуцирует экспрессию расщепленной каспазы 3, что сопровождается повышением количества клеток с признаками апоптоза [22].

Помимо потери или сверхэкспрессии ЦК, на изменение предрасположенности к апоптозу могут влиять и мутации. Так, избыточная экспрессия мутантного ЦК18 является предрасполагающим фактором для гепатоцитов к Fas-опосредованному апоптозу [23]. Напротив, в эпидермисе экспрессия мутантных ЦК10/ЦК14

приводит к подавлению апоптоза, тем самым увеличивая предрасположенность к раку кожи [24].

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКЕРАТИНОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И СТВОЛОВЫЕ СВОЙСТВА

H. Alam и соавт. [25] продемонстрировали значительное снижение пролиферации клеток линий HaCaT и плоскоклеточной карциномы полости рта AW13516 в ответ на подавление пары ЦК5/ЦК14. Цитоцератин 17 взаимодействует с каркасным белком 14-3-3 σ , который необходим для активации мишени рапамицина млекопитающих и клеточной пролиферации. Комплекс ЦК5/ЦК17/14-3-3 σ взаимодействует с актиновым цитоскелетом для увеличения инвазивности клеток базальноподобного РМЖ. В клетках карциномы молочной железы ЦК17 связывается с p27 KIP1, вызывает его ядерный экспорт и последующий фазовый переход клеток G1 – S, таким образом, ЦК17 стимулирует вход в клеточный цикл [26]. Исследования на клеточных линиях рака поджелудочной железы показали, что нокдаун ЦК17 в клетках SW1990 и CFPAC-1 увеличивает количество клеток в фазах G1 и G2 и уменьшает количество клеток в фазе S; при этом активация ЦК17 в клетках HPDE6-C7 и PANC-1 уменьшает количество клеток в фазах G1 и G2 и приводит к увеличению количества клеток в фазе S [22].

Показано, что ЦК18 может играть регулируемую роль при гормонозависимом РМЖ за счет связывания с LRP16 (геном-мишенью и коактиватором эстрогеновых рецепторов α в цитоплазме), тем самым ослабляя передачу сигналов и стимулированное эстрогеном развитие клеточного цикла в клетках опухоли молочной железы [27].

В ходе исследования передачи сигналов TGF- β /SMAD в клетках, положительных по ЦК19, вестерн-блоттинг показал, что экспрессия pSmad2 в них сильнее, чем в клетках без ЦК19. Нокдаун ЦК19 приводит к значительному подавлению экспрессии pSmad2 и способности к пролиферации [28]. Исследование ЦК19 является необходимым для поддержания фосфорилирования киназы-3 β гликогенсинтазы по Ser9, приводящего к предотвращению накопления белка GSK3 β в ядре, поддержанию уровня циклина D3, и пролиферации клеток [29].

В наименьшей степени изучена связь ЦК с изменением стволовых свойств клеток карцином. Было обнаружено, что экспрессия ЦК19 может способствовать приобретению опухолью свойств стволовых клеток. В клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы клетки, экспрессирующие ЦК19, способны образовывать фракции как ЦК19+, так и ЦК19-, в то время как клетки без экспрессии ЦК19 дают начало только себе подобным [28].

Экспрессия канцероген-чувствительного слитого варианта ЦК6-ЦК14/V7 в клетках плоскоклеточной карциномы полости рта повышала передачу сигналов трансформирующего фактора роста (transforming

growth factor β , TGF- β), приводя к увеличению маркера стволовости CD44 и агрессивности рака [30].

УЧАСТИЕ ЦИТОКЕРАТИНОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОМ ПЕРЕХОДЕ

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) представляет собой процесс изменения фенотипа эпителиальных клеток на мезенхимальный и является неотъемлемой частью опухолевой прогрессии. Цитокератины, будучи маркерами клеток эпителиальной природы, подавляются в процессе ЭМП, а клетка приобретает другие маркеры, свойственные мезенхимальному фенотипу. В настоящее время вопрос о том, с помощью каких механизмов и в какой последовательности происходит потеря ЦК эпителиальных клеток в процессе ЭМП, активно изучается. Однако роль ЦК при ЭМП остается неоднозначной. Так, показано, что в клетках линии MCF7 трансфекция гена ЦК16 сопровождается повышением экспрессии мезенхимальных специфических генов *VIM*, *CDH2*, *SNAI2*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST1* и *WNT5A*. В то же время в дикой линии MCF7 с дефицитом ЦК16 экспрессия этих мезенхимально-ассоциированных генов значительно ниже, а генов, ассоциированных с эпителиальным фенотипом, таких как *CDH1*, *KRT8*, *KRT18*, *KRT19* и *CD24*, остается неизменной [31]. В ходе изучения механизма сверхэкспрессии *KRT16* было обнаружено, что транскрипционный фактор AP-2 α , который также влияет на ЭМП, положительно коррелирует с уровнем ЦК16 [32]. Предположительно транскрипционный фактор AP-2 α способен связываться с промоторным регионом *KRT16*.

Еще одно исследование демонстрирует одномоментное повышение экспрессии мезенхимных и эпителиальных генов в ответ на индукцию трансформирующим фактором роста β -1 (TGF- β 1). Так, в клетках линии OVCAR3 при обработке TGF- β 1 и возникновении гипоксии в разной степени увеличивается экспрессия мезенхимальных маркеров, включая N-кадгерин, виментин и *ZEB1*, и эпителиальных маркеров, в том числе ЦК14 и ЦК19. Принимая во внимание такие противоречивые данные, авторы подтверждают, что изменение морфологии части клеток запускает ЭМП [33].

В эксперименте на клеточной линии PMЖ MCF10A, которую в течение 24 ч обрабатывали TGF- β 1, наблюдались значительные морфологические изменения, указывающие на ранние стадии ЭМП. При этом ЦК18 подавлялся, однако уровни E-кадгерина оставались неизменными. На основании этих данных было выдвинуто предположение о том, что ЦК18 может играть большую роль на ранних стадиях ЭМП. Кроме того, показано, что отсутствие ЦК18 способно задерживать TGF- β 1-опосредованный ЭМП и связанное с этим подавление E-кадгерина. Также наблюдаются снижение фосфорилирования SMAD2/3 и снижение уровней экспрессии белка Snail, который ингибирует экспрессию E-кадгерина в эпителиальных клетках в ответ

на TGF- β 1. Авторы резонно предполагают, что ЦК18 может способствовать TGF- β 1-индуцированному ЭМП посредством SMAD2/3-опосредованной регуляции экспрессии Snail в эпителиальных клетках молочной железы. Нельзя не отметить тот факт, что снижение уровня ЦК18 предшествует уменьшению уровня E-кадгерина, что указывает на последовательность процессов при ЭМП, индуцированном TGF- β 1 [34].

Следует отметить, что клетки гепатоцеллюлярной карциномы, экспрессирующие ЦК19, демонстрируют профиль экспрессии генов ЭМП: подавление *CDH1* и повышение уровней *TGFBR1*, *SNAI1* и *VIM* [28]. На клеточных линиях рака яичника показано, что *KRT23*-опосредованный ЭМП осуществляется путем регуляции уровней p-Smad2/3 в сигнальном пути TGF- β /Smad [35].

В эксперименте на клетках линии MCF7 при обработке TNF- α и костимулировании TGF- β 1 выявлены подавление *KRT18*, снижение экспрессии *CDH1*, а также повышение уровней *CDH2* и *VIM*. При этом воздействие TGF- β 1 и TNF- α , по отдельности или в комбинации, приводило к значительному усилению экспрессии белка EpCAM. Подавление ЦК18 вызывало увеличение экспрессии EpCAM, вероятно, за счет активации пути Wnt/ β -catenin, тем самым способствуя ЭМП и появлению свойств стволовости в клетках PMЖ [36].

Потеря ЦК18 увеличивала экспрессию белка VSCR, приводила к индукции ЭМП и была связана с активацией сигнального пути NF- κ B/Snail [37]. Было установлено, что потеря ЦК8/ЦК18 усиливает транскрипционную активность NF- κ B через путь PI3K, в клетках карциномы эндометрия, шейки матки и гепатоцеллюлярной карциномы. Активация NF- κ B может вызывать повышение экспрессии белка Snail, что напрямую подавляет транскрипцию E-кадгерина и увеличивает экспрессию N-кадгерина и виментина, впоследствии вызывая ЭМП [38].

Существуют данные, что нокаунт *KRT17* индуцирует ЭМП за счет снижения экспрессии E-кадгерина и увеличения экспрессии виментина [39]. Эксперименты, проведенные на клеточных линиях A549, H1299 и SK-MES-1 рака легкого, показали, что сверхэкспрессия *KRT17* повышает активность β -катенина и уровни генов-мишеней Wnt, таких как циклин D1, c-Myc и MMP7. Более того, *KRT17* способствует ЭМП, повышая экспрессию виментина, MMP-9 и Snail и подавляя экспрессию E-кадгерина *in vitro* [40].

ЦИТОКЕРАТИНЫ И ИНВАЗИВНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК

Известно, что протеазы необходимы для инвазии опухолевых клеток, они должны быть активированными либо на поверхности опухолевых клеток, либо в перичеселлюлярном пространстве. Цитокератин 8 является важным белком на мембране клеток PMЖ, связывающим плазминоген. Этот ЦК отличается от других

тем, что содержит карбоксиконцевой лизин, который может взаимодействовать с лизинсвязывающими сайтами плазминогена. Цитокератин 8 способен связывать плазминоген даже при мутации С-концевого лизина. Активации плазминогена способствует его тканевой активатор, создавая связи с любым из компонентов гетеродимера ЦК8/ЦК18. Комплекс ЦК8/ЦК18 модулирует сигнальные пути внутриклеточно через киназы, участвующие в передаче сигнала. Переход плазминогена в плазмин делает возможной деградацию белков внеклеточного матрикса – процесс, увеличивающий инвазивный потенциал опухолевых клеток [39].

Кроме того, потеря ЦК8/ЦК18 индуцирует значительное увеличение уровня белка клаудина-1. По данным литературы, он связан с инвазивным потенциалом клеток [41]. Таким образом, потеря ЦК8/ЦК18 может приводить к усилению подвижности и инвазии эпителиальных клеток рака за счет усиления экспрессии клаудина-1 и его локализации в клеточной мембране и ядре [38]. Более того, нокдаун генов ЦК8/ЦК18 усиливает коллективную миграцию и инвазивные свойства клеточных линий карциномы эндометрия, шейки матки и гепатоцеллюлярной карциномы без модуляции маркеров ЭМП. Показано, что это происходит за счет гиперактивации PI3K/Akt/NF-κB и усиления экспрессии металлопротеиназы-2 и металлопротеиназы-9 [38].

Исследования V.K. Lam и соавт. на клеточных линиях MDA-MB-231 показали, что нокдаун гена ЦК19 сопровождается ускорением движения отдельных опухолевых клеток по сравнению с родительскими на жесткой поверхности, но это прекращалось, когда клетки помещали на коллаген. В целом авторы предполагают, что ЦК19 ингибирует подвижность клеток, регулируя форму клеток в зависимости от субстрата [42]. Более поздние работы на клеточной линии РМЖ MCF7 показали, что ЦК19 поддерживает локализацию E-кадгерина на клеточной поверхности и стабилизирует межклеточную адгезию [43].

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКЕРАТИНОВ НА ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Было выявлено, что короткий вариант FLICE-подобного ингибирующего белка, который является ингибитором передачи сигналов рецептора гибели Fas, был значительно снижен в ЦК8/ЦК18-истощенных клеточных линиях карциномы эндометрия, шейки матки и гепатоцеллюлярной карциномы, подвергаемых воздействию цисплатина [38]. На основе этих данных можно предположить, что механизм усиления опосредованного цисплатином апоптоза в клетках, лишенных ЦК8/ЦК18, реализуется через рецептор смерти Fas. Однако потеря ЦК может проявлять себя по-разному в клетках опухолей различной локализации. Так, например, в тканях РМЖ и линии клеток

со множественной лекарственной устойчивостью, экспрессирующей белок BCRP, экспрессия ЦК18 была значительно ниже [37]. Клетки, положительные по ЦК19, показали более высокую устойчивость к противоопухолевому препарату 5-фторурацилу, чем клетки, не экспрессирующие ЦК19 [28].

Согласно результатам исследования S.K. Saha и соавт., потеря ЦК19 значительно усиливает экспрессию маркеров лекарственной устойчивости, таких как ALDH1, ABCG2, ABCC1 и ABCB1. Для того чтобы оценить возможность развития лекарственной устойчивости у ЦК19-отрицательных клеток, была проведена проверка их выживаемости в присутствии нескольких доз противоопухолевого препарата доксорубин [44]. Полученные данные свидетельствуют о том, что подавление ЦК19 связано с устойчивостью клеток к воздействию этого лекарственного средства, а сверхэкспрессия ЦК19, напротив, приводит к снижению выживаемости клеток.

Сверхэкспрессия ЦК5 связана с устойчивостью к химиотерапии и плохим прогнозом у пациентов с серозным раком яичников. Авторы полагают, что сверхэкспрессия этого цитокина может быть использована для выявления резистентных к данной терапии пациентов [45].

Таким образом, для преодоления резистентности к цисплатину при карциноме эндометрия, шейки матки и гепатоцеллюлярной карциноме важна потеря ЦК8/ЦК18. Стоит отметить, что клетки РМЖ со множественной лекарственной устойчивостью характеризуются снижением экспрессии ЦК8/ЦК18. Потеря ЦК19 важна для преодоления резистентности к 5-фторурацилу, а сверхэкспрессия ЦК19 способствует преодолению резистентности к доксорубину. У пациентов с серозным раком яичников сверхэкспрессия ЦК5 ассоциирована с химиорезистентностью и плохим прогнозом.

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ЦИТОКЕРАТИНОВ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что роль ЦК в движении/инвазии, апоптозе, пролиферации, ЭМП не является «пассивной». Вероятно, в некоторых процессах изменения ЦК могут играть роль триггера (см. таблицу). Этот вывод не только имеет фундаментальное значение, но и обуславливает необходимость поиска способов управления указанными процессами путем воздействия на ЦК.

Анализ роли ЦК в движении/инвазии, апоптозе, пролиферации и ЭМП возможен на примере ЦК18. Участие этого ЦК в указанных процессах наиболее полно изложено в обзоре. Исходя из известных закономерностей развития ЭМП, запуск данного процесса наряду с другими важными изменениями сопровождается уменьшением/прекращением экспрессии ЦК (вследствие чего нарушается апико-базальная поляризация), появлением мезенхимной фибробластоподобной

Функции цитокератинов (ЦК)

Function of cytokeratins (CK)

| Цитокератин Cytokeratin | Функция Function | Источник Source |
|--------------------------------------|--|--------------------|
| ЦК5 CK5 | Ассоциирован с химиорезистентностью и плохим прогнозом у пациентов с серозным раком яичников Associated with chemoresistance and poor prognosis in patients with serous ovarian cancer | [45] |
| ЦК5/14 CK5/14 | Усиливает пролиферативные свойства клеток плоскоклеточной карциномы полости рта Increases proliferative activity of oral squamous cell carcinoma cells | [25] |
| ЦК5/ЦК17/14–3–3σ CK5/CK17/14–3–3σ | Увеличивают инвазивные свойства клеток базальноподобного РМЖ Increase invasive activity of basal-like BC cells | [25] |
| ЦК8 CK8 | Ингибирует апоптоз Inhibits apoptosis | [19] |
| | Участвует в развитии клеточного цикла клеток РМЖ Involved in evolution of BC cell cycle | [27] |
| ЦК8/ЦК18 CK8/CK18 | Ингибирует апоптоз клеток РМЖ Inhibits apoptosis of breast cancer cells | [18] |
| | Потеря ЦК8/ЦК18 увеличивает инвазивный потенциал опухолевых клеток Loss of CK8/CK18 increases invasive potential of tumor cells | [38, 41] |
| | Способствует резистентности клеток карциномы эндометрия, шейки матки и гепатоцеллюлярной карциномы к цисплатину Promotes resistance of endometrial, cervical and hepatocellular carcinoma cells against cisplatin | [38] |
| ЦК16 CK16 | Участвует в ЭМП Involved in EMT | [31, 32] |
| ЦК17 CK17 | Индукцирует апоптоз Initiates apoptosis | [22] |
| | Усиливает пролиферативные свойства клеток Increases proliferative activity of cells | [25] |
| | Стимулирует вход в клеточный цикл клеток карциномы молочной железы Stimulates breast carcinoma cells to enter cell cycle | [26] |
| | Увеличивает количество клеток рака поджелудочной железы в фазе S Increases the number of pancreatic cancer cells in phase S | [22] |
| ЦК18 CK18 | Индукцирует апоптоз Induces apoptosis | [16] |
| | Играет большую роль в стимулированном эстрогеном развитии клеточного цикла в клетках гормонозависимого РМЖ Plays a large role in estrogen-stimulated evolution of cells cycle in hormone-sensitive BC cells | [27] |
| | Играет большую роль на ранних стадиях ЭМП Plays a large role at early EMT stages | [34] |
| | Потеря ЦК18 приводит к индукции ЭМП в клетках карциномы эндометрия, шейки матки и гепатоцеллюлярной карциномы Loss of CK18 leads to EMT induction in endometrial, cervical and hepatocellular carcinoma cells | [37, 38] |
| | Участвует в пролиферативной активности, а также инвазивной способности клеток рака желудка Involved in proliferative activity, as well as in invasive ability of gastric cancer cells | [46] |
| ЦК19 CK19 | Участвует в пролиферации клеток Involved in cell proliferation | [28, 29] |
| | Способствует приобретению клеток гепатоцеллюлярной карциномы стволовых свойств Promotes stem cell-like qualities in hepatocellular carcinoma cells | [28] |

Окончание таблицы

The end of table

| Цитокератин Cytokeratin | Функция Function | Источник Source |
|---|---|--------------------|
| ЦК19 CK19 | Участвует в ЭМП клеток гепатоцеллюлярной карциномы Involved in EMT of hepatocellular carcinoma cells | [28] |
| | Ингибирует инвазивные свойства клеток, стабилизирует межклеточную адгезию Inhibits invasive properties of cells, stabilizes intercellular adhesion | [42, 43] |
| | Способствует лекарственной устойчивости к 5-фторурацилу Promotes drug resistance against 5-fluorouracil | [28] |
| | Играет большую роль в преодолении резистентности к доксорубину Plays a large role in overcoming resistance to doxorubicin | [44] |
| Канцероген-чувствительный ЦК6-ЦК14/V7 Carcinogen-sensitive CK6-CK14/V7 | Увеличивает экспрессию маркера стволовости CD44 и способствует более агрессивному течению плоскоклеточной карциномы полости рта Increases expression of stem cell marker CD44 and promotes more aggressive progression of oral squamous cell carcinoma | [30] |
| Мутантный ЦК10/ЦК14 Mutant CK10/CK14 | Ингибирует апоптоз клеток эпидермиса Inhibits apoptosis in epidermal cells | [24] |
| Мутантный ЦК18 Mutant CK18 | Индукцирует апоптоз гепатоцитов Induces apoptosis in hepatocytes | [23] |

Примечание. ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; РМЖ – рак молочной железы.

Note. EMT – epithelial-mesenchymal transition; BC – breast cancer.

морфологии, ингибированием пролиферации эпителия, приобретением клеток, способных к движению/инвазии. Механизм такой инвазии обозначается как мезенхимный, или фибробластоподобный. Кроме того, клетки в состоянии ЭМП становятся устойчивыми к апоптозу.

Что же происходит с ЦК при указанных процессах? Обработка клеток линии MCF10A TGF- β 1 в течение 24 ч приводила к морфологическим изменениям, указывающим на ранние стадии ЭМП. При этом экспрессия ЦК18 подавлялась [34]. Подобные результаты получены и при стимуляции опухолевых клеток линии MCF7 TGF- β 1 и TNF- α , которая вызывала классические проявления ЭМП (снижение экспрессии E-кадгерина, повышение уровней N-кадгерина и виментина) и подавление экспрессии ЦК18 [36]. Подавление экспрессии ЦК18 в этих наблюдениях скорее вторично по отношению к инициации ЭМП и вряд ли может рассматриваться как пример регуляторной роли ЦК18 в развитии ЭМП. Вместе с тем имеются наблюдения, показывающие, что стабильный нокдаун K8/18 с помощью shRNA увеличивает коллективную миграцию и инвазивность эпителиальных раковых клеток без модуляции маркеров ЭМП. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что ЦК имеют большое значение в прогрессии карцином [38]. Еще одним доводом в пользу значимой роли ЦК18 в прогрессии опухоли является его место в индукции

апоптоза. В соответствии с классическими представлениями ЭМП увеличивает резистентность к апоптозу и уменьшает экспрессию ЦК. Однако имеются наблюдения, свидетельствующие, что исходная потеря ЦК8/ЦК18 приводит, наоборот, к увеличению чувствительности клеток к TNF- α -индуцированному апоптозу благодаря специфическому связыванию с рецептором TNF- α типа 1 [16].

Что касается влияния ЦК18 на пролиферативную активность, показано, что ингибирование экспрессии ЦК18 при раке желудка сочетается с подавлением пролиферативной активности, а также инвазивной способности. Эти эффекты трудно считать следствием активности ЦК18, не связанной с развитием ЭМП [46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изменения экспрессии ЦК в некоторых функциональных ситуациях вторичны и отражают развитие ЭМП. Наряду с этим они способны влиять на фенотип клеток карцином на транскрипционном уровне, что может свидетельствовать о значительной роли ЦК в прогрессии карцином. Однако следует признать, что авторы исследований функциональной активности ЦК, как правило, не обсуждают их самостоятельное регуляторное значение или вторичный характер по отношению к ЭМП.

Многое остается не ясным. Например, в чем заключаются функциональные различия внутри групп

низко- и высокомолекулярных ЦК? Существует ли разделение функций ЦК, одновременно экспрессируемых в одной клетке? Имеется ли закономерная очерченность снижения синтеза разных ЦК при развитии ЭМП? Есть ли перспектива на основе более точных знаний о временном соотношении избирательного уменьшения синтеза ЦК с экспрессией транскрипци-

онных факторов ЭМП более точно маркировать фенотип ЭМП: эпителиальный, вариант гибридного или мезенхимный? Еще больше возникает вопросов, касающихся закономерностей экспрессии ЦК при ЭМП в карциномах и саркомах, их синтеза в клетках фибробластического ряда (прежде всего миофибробластах) и некоторых гемопоэтических клетках.

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

- Jacob J., Coulombe P., Kwan R. et al. Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(4):a018275. DOI: 10.1101/cshperspect.a018275
- Moll R., Divo M., Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008;129(6):705–33. DOI: 10.1007/s00418-008-0435-6
- Werner S., Keller L., Pantel K. Epithelial keratins: biology and implications as diagnostic markers for liquid biopsies. *Mol Aspects Med* 2020;72(5):100817. DOI: 10.1016/j.mam.2019.09.001
- Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011;30(2):127–38. DOI: 10.1038/onc.2010.456
- Ho M., Thompson B., Fisk J. et al. Update of the keratin gene family: evolution, tissue-specific expression patterns, and relevance to clinical disorders. *Hum Genomics* 2022;16(1):1–21. DOI: 10.1186/s40246-021-00374-9
- Komine M., Freedberg I., Blumenberg M. Regulation of epidermal expression of keratin K17 in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 1996;107(4):569–75. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12582820
- Komine M., Rao L., Kaneko T. et al. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. *J Biol Chem* 2000;275(41):32077–88. DOI: 10.1074/jbc.M001253200
- Völkel C., De Wispelaere N., Weidemann S. et al. Cytokeratin 5 and cytokeratin 6 expressions are unconnected in normal and cancerous tissues and have separate diagnostic implications. *Virchows Arch* 2022;480(2):433–47. DOI: 10.1007/s00428-021-03204-4
- Coulombe P., Fuchs E. Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol* 1990;111(1):153–69. DOI: 10.1083/jcb.111.1.153
- Inaba Y., Chauhan V., van Loon A.P. et al. Keratins and the plakins family cytolinker proteins control the length of epithelial microridge protrusions. *Elife* 2020;9:e58149. DOI: 10.7554/eLife.58149
- Windoffer R., Beil M., Magin T. et al. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol* 2011;194(5):669–78. DOI: 10.1083/jcb.201008095
- Snider N., Omary M. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):163–77. DOI: 10.1038/nrm3753
- Hrudka J., Fišerová H., Jelínková K. et al. Cytokeratin 7 expression as a predictor of an unfavorable prognosis in colorectal carcinoma. *Sci Rep* 2021;11(1):17863. DOI: 10.1038/s41598-021-97480-4
- Dum D., Menz A., Völkel C. et al. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in cancer: a tissue microarray study on 15,424 cancers. *Exp Mol Pathol* 2022;126:104762. DOI: 10.1016/j.yexmp.2022.104762
- Han W., Hu C., Fan Z.J. et al. Transcript levels of keratin 1/5/6/14/15/16/17 as potential prognostic indicators in melanoma patients. *Sci Rep* 2021;11(1):1023. DOI: 10.1038/s41598-020-80336-8
- Weng Y., Cui Y., Fang J. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. *Mol Cancer Res* 2012;10(4):485–93. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0222
- Willms A., Schupp H., Poelker M. et al. TRAIL-receptor 2 — a novel negative regulator of p53. *Cell Death Dis* 2021;12(8):757. DOI: 10.1038/s41419-021-04048-1
- Bozza W., Zhang Y., Zhang B. Cytokeratin 8/18 protects breast cancer cell lines from TRAIL-induced apoptosis. *Oncotarget* 2018;9(33):23264–73. DOI: 10.18632/oncotarget.25297
- Ku N., Omary M. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* 2006;174(1):115–25. DOI: 10.1083/jcb.200602146
- Chen Y., Lin S., Chang W. et al. Requirement for ERK activation in acetone extract identified from *Bupleurum scorzoniferifolium* induced A549 tumor cell apoptosis and keratin 8 phosphorylation. *Life Sci* 2005;76(21):2409–20. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.09.044
- Arentz G., Chataway T., Condina M. et al. Increased phosphokeratin 8 isoforms in colorectal tumors associated with EGFR pathway activation and reduced apoptosis. *ISRN Mol Biol* 2012;706545. DOI: 10.5402/2012/706545
- Zeng Y., Zou M., Liu Y. et al. Keratin 17 suppresses cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Front Med* 2020;7:572494. DOI: 10.3389/fmed.2020.572494
- Weerasinghe S., Ku N., Althuler P. et al. Mutation of caspase-digestion sites in keratin 18 interferes with filament reorganization, and predisposes to hepatocyte necrosis and loss of membrane integrity. *J Cell Sci* 2014;127(Pt. 7):1464–75. DOI: 10.1242/jcs.138479
- Chen J., Cheng X., Merched-Sauvage M. et al. An unexpected role for keratin 10 end domains in susceptibility to skin cancer. *J Cell Sci* 2006;119(Pt. 24):5067–76. DOI: 10.1242/jcs.03298
- Alam H., Gangadaran P., Bhate A.V. et al. Loss of keratin 8 phosphorylation leads to increased tumor progression and correlates with clinico-pathological parameters of OSCC patients. *PLoS One* 2011;6(11):e27767. DOI: 10.1371/journal.pone.0027767
- McGinn O., Ward A., Fetting L. et al. Cytokeratin 5 alters β -catenin dynamics in breast cancer cells. *Oncogene* 2020;39(12):2478–92. DOI: 10.1038/s41388-020-1164-0
- Meng Y., Wu Z., Yin X. et al. Keratin 18 attenuates estrogen receptor alpha-mediated signaling by sequestering LRP16 in cytoplasm. *BMC Cell Biol* 2009;10:96. DOI: 10.1186/1471-2121-10-96
- Kawai T., Yasuchika K., Ishii T. et al. Keratin 19, a cancer stem cell marker in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21(13):3081–91. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1936
- Sharma P., Tiufekchiev S., Lising V. et al. Keratin 19 interacts with GSK3 β to regulate its nuclear accumulation and degradation of cyclin D3. *Mol Biol Cell* 2021;32(21):ar21. DOI: 10.1091/mbc.E21-05-0255
- Tsai F., Lai M., Cheng J. et al. Novel K6-K14 keratin fusion enhances cancer stemness and aggressiveness in oral squamous cell

- carcinoma. *Oncogene* 2019;38(26):5113–26. DOI: 10.1038/s41388-019-0781-y
31. Elazezy M., Schwentesius S., Stegat L. et al. Emerging insights into keratin 16 expression during metastatic progression of breast cancer. *Cancers* 2021;13(15):3869. DOI: 10.3390/cancers13153869
 32. Yuanhua L., Pudong Q., Wei Z. et al. TFAP2A induced KRT16 as an oncogene in lung adenocarcinoma via EMT. *Int J Biol Sci* 2019;15(7):1419–28. DOI: 10.7150/ijbs.34076
 33. Ghosh D., Hsu J., Soriano K. et al. Spatial heterogeneity in cytoskeletal mechanics response to TGF- β 1 and hypoxia mediates partial epithelial-to-mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer cells. *Cancers (Basel)* 2023;15(12):3186. DOI: 10.3390/cancers15123186.
 34. Hyejung J., Bomin K., Byung M. et al. Cytokeratin 18 is necessary for initiation of TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in breast epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 2016;423(1–2):21–8. DOI: 10.1007/s11010-016-2818-7
 35. Ren M., Gao Y., Chen Q. et al. The Overexpression of keratin 23 promotes migration of ovarian cancer via epithelial-mesenchymal transition. *Biomed Res Int* 2020;2020:1–12. DOI: 10.1155/2020/8218735
 36. Shi R., Liu L., Wang F. et al. Downregulation of cytokeratin 18 induces cellular partial EMT and stemness through increasing EpCAM expression in breast cancer. *Cell Signal* 2020;76:109810. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109810
 37. Shi R., Wang C., Fu N. et al. Downregulation of cytokeratin 18 enhances BCRP-mediated multidrug resistance through induction of epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in breast cancer. *Oncol Rep* 2019;41(5):3015–26. DOI: 10.3892/or.2019.7069
 38. Fortier A., Asselin E., Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* 2013;288(16):11555–71. DOI: 10.1074/jbc.M112.428920
 39. Obermajer N., Doljak B., Kos J. Cytokeratin 8 ectoplasmic domain binds urokinase-type plasminogen activator to breast tumor cells and modulates their adhesion, growth and invasiveness. *Mol Cancer* 2009;8:88. DOI: 10.1186/1476-4598-8-88
 40. Wang Z., Yang M., Lei L. et al. Overexpression of KRT17 promotes proliferation and invasion of non-small cell lung cancer and indicates poor prognosis. *Cancer Manag Res* 2019;11:7485–97. DOI: 10.2147/CMAR.S218926
 41. Wu X., Xiao J., Zhao C. et al. Claudin1 promotes the proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells by upregulating the expression and nuclear entry of β -catenin. *Exp Ther Med* 2018;16(4):3445–51. DOI: 10.3892/etm.2018.6619
 42. Lam V., Sharma P., Nguyen T. et al. Morphology, motility, and cytoskeletal architecture of breast cancer cells depend on keratin 19 and substrate. *Cytometry A* 2020;97(11):1145–55. DOI: 10.1002/cyto.a.24011
 43. Alsharif S., Sharma P., Bursch K. et al. Keratin 19 maintains E-cadherin localization at the cell surface and stabilizes cell-cell adhesion of MCF7 cells. *Cell Adh Migr* 2021;15(1):1–17. DOI: 10.1080/19336918.2020.1868694
 44. Saha S., Kim K., Yang G. et al. Cytokeratin 19 (KRT19) has a role in the reprogramming of cancer stem cell-like cells to less aggressive and more drug-sensitive cells. *Int J Mol Sci* 2018;19(5):1423–44. DOI: 10.3390/ijms19051423
 45. Ricciardelli C., Lokman N., Pyragius C. et al. Keratin 5 overexpression is associated with serous ovarian cancer recurrence and chemotherapy resistance. *Oncotarget* 2017;8(11):17819–32. DOI: 10.18632/oncotarget.14867
 46. Wang P., Chen Y., Ding G. et al. Keratin 18 (KRT18) induces proliferation, migration, and invasion in gastric cancer *via* the MAPK signaling pathway. *Clin Exp Pharmacol* 2020;48(1):147–56. DOI: 10.1111/1440-1681.13401

Вклад авторов

М.А. Болдышевская, Е.С. Андрюхова, Т.А. Дронова: написание текста статьи;
С.В. Вторушин, Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер: руководство работой, редактирование.

Authors' contributions

M.A. Boldyshevskaya, E.S. Andryukhova, T.A. Dronova: article writing;
S.V. Vtorushin, L.A. Tashireva, V.M. Perelmuter: work management, editing.

ORCID авторов / ORCID authors

М.А. Болдышевская / M.A. Boldyshevskaya: <https://orcid.org/0000-0002-2399-4170>
Л.А. Таширева / L.A. Tashireva: <https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>
Е.С. Андрюхова / E.S. Andryukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0909-9206>
Т.А. Дронова / T.A. Dronova: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>
С.В. Вторушин / S.V. Vtorushin: <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>
В.М. Перельмутер / V.M. Perelmuter: <https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 23-15-00135).
Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 23-15-00135).

Статья поступила: 31.08.2023. **Принята к публикации:** 22.09.2023.
Article submitted: 31.08.2023. **Accepted for publication:** 22.09.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-86-96>

Молекулярно-генетические маркеры риска развития кардиотоксичности, индуцированной химиотерапией, у больных онкогематологическими заболеваниями: обзор литературы

Ю.С. Милюткина, А.С. Сустретов, Л.В. Лимарева

Научно-образовательный профессиональный центр генетических и лабораторных технологий ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 443079 Самара, ул. Гагарина, 20

Контакты: Юлия Сергеевна Милюткина yu.s.milyutkina@samsmu.ru

Кардиотоксичность противоопухолевых препаратов является серьезным нежелательным явлением со стороны сердечно-сосудистой системы, неблагоприятно влияющим на выживаемость онкологических больных. Современные методы диагностики кардиотоксических эффектов основаны на выявлении уже существующих повреждений, сопряженных с симптомами сердечной недостаточности, и не подходят для прогнозирования ранних изменений в сердечной ткани на фоне лечения. В последнее время все больше внимания уделяется поиску молекулярно-генетических маркеров, однократная идентификация которых до начала лечения позволит определить риск развития кардиотоксичности и скорректировать терапию с учетом индивидуальных генетических особенностей пациентов. При этом большинство исследований влияния аллельных вариантов генов на сердечно-сосудистые осложнения относятся к химиотерапии солидных опухолей. В данном обзоре рассмотрены возможные прогностические генетические варианты риска развития кардиотоксичности, индуцированной химиотерапией, у пациентов со злокачественными новообразованиями лимфатической и кроветворной тканей.

Ключевые слова: кардиотоксичность, генетические варианты, онкогематология, персонализированная противоопухолевая терапия

Для цитирования: Милюткина Ю.С., Сустретов А.С., Лимарева Л.В. Молекулярно-генетические маркеры риска развития кардиотоксичности, индуцированной химиотерапией, у больных онкогематологическими заболеваниями: обзор литературы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):86–96. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-86-96>

Molecular genetic markers of chemotherapy-induced cardiotoxicity in patients with oncohematological diseases (review)

Yu. S. Milyutkina, A. S. Sustretov, L. V. Limareva

Scientific and Educational Professional Center of Genetic and Laboratory Technologies of Samara State Medical University, Ministry of Health of Russia; 20 Gagarin St., Samara 443079, Russia

Contacts: Yuliya Sergeevna Milyutkina yu.s.milyutkina@samsmu.ru

Cardiotoxicity of anticancer therapy is a severe adverse cardiovascular event affecting the survival of cancer patients. Modern methods for diagnosing cardiotoxicity allow to identify already occurred myocardial transformations, accompanied by symptoms of heart failure and are not predict and detect early changes in the heart tissue during treatment. Recently, increasing attention is paid to the search for molecular genetic markers, a single identification of which before starting treatment will make possible to determining the risks of cardiotoxicity and change treatment taking into account individual genetic characteristics. At the same time, most research on the effect of allelic variants of genes on cardiovascular complications relate to chemotherapy of solid tumors. The review considered possible prognostic genetic variants of cardiotoxicity induced by chemotherapy in patients with the hematopoietic and lymphatic malignancies.

Keywords: cardiotoxicity, genetic variants, oncohematology, personalized antitumor therapy

For citation: Milyutkina Yu.S., Sustretov A.S., Limareva L.V. Molecular genetic markers of chemotherapy-induced cardiotoxicity in patients with oncohematological diseases: review. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):86–96. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-86-96>

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире наблюдается тенденция к увеличению количества выявленных случаев злокачественных новообразований, в том числе опухолей лимфатической и кроветворной тканей [1, 2]. Вместе с тем, с одной стороны, совершенствование лекарственной терапии привело к снижению смертности от данной патологии и росту выживаемости в целом, а с другой, врачи столкнулись с новой проблемой – возникновением тяжелых побочных, прежде всего кардиотоксических, эффектов, оказывающих существенное влияние на долгосрочные показатели выживаемости пациентов [3, 4]. На сегодняшний день диагностика кардиотоксических эффектов химиотерапии (ХТ) включает в себя проведение эхокардиографии и определение уровня сердечных биомаркеров (тропонина I или T, натрийуретических пептидов BNP и pro-BNP) до начала и в процессе лечения [5]. Американское эхокардиографическое общество (American Society of Echocardiography, ASE) и Европейская ассоциация сердечно-сосудистой визуализации (European Association of Cardiovascular Imaging, EACVI) главным критерием кардиотоксичности ХТ, ассоциированной с симптомами сердечной недостаточности, определили снижение фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) на 10 % и более (при этом его значение должно быть меньше 50 %) [6]. Прогностически значимыми маркерами дальнейшего уменьшения ФВ ЛЖ являются уменьшение общей продольной деформации миокарда (global longitudinal strain, GLS) более чем на 15 % исходной величины и уровень тропонина I или T выше референсных значений. Однако данные методы диагностики обладают низкой чувствительностью для раннего выявления кардиотоксичности, поскольку значимое снижение ФВ ЛЖ регистрируется только при большом объеме повреждения кардиомиоцитов [7, 8].

В последнее время онкогематологи уделяют все больше внимания возможности раннего прогнозирования рисков развития кардиологических осложнений у пациентов вследствие лекарственной терапии за счет определения их генетических особенностей [9–11]. Актуальность проблемы подтверждается фактом включения в 2022 г. в рекомендации по кардиоонкологии Европейского общества кардиологов (European Society of Cardiology, ESC) генетического скрининга больных с онкогематологическими заболеваниями до начала лечения в целях оценки рисков развития кардиотоксичности. В документе описаны 40 генов-кандидатов, ассоциированных с риском возникновения сердечно-сосудистых осложнений ХТ [12].

Несмотря на активные исследования на протяжении последних двух десятилетий, патогенетические механизмы развития кардиотоксичности остаются не до конца понятыми. Во многих работах отмечается, что основной вклад в патогенез кардиотоксичности, индуцированной ХТ, у онкогематологических больных вносят молекулы, регулирующие окислительно-антиоксидантное равновесие, метаболизм железа, накопление и биотрансформацию ксенобиотиков, а также механизм, связанный с ингибированием двуцепочечных разрывов ДНК, опосредованных топоизомеразой 2 β (Top2 β). При этом отмечается связь различных аллелей генов, кодирующих данные молекулы, с повышением или снижением риска развития кардиотоксичности, вызванной ХТ [13–18]. Имеющиеся в базах данных публикации обобщают информацию о молекулярно-генетических факторах риска развития сердечно-сосудистых осложнений вследствие ХТ солидных опухолей. В настоящем обзоре систематизированы данные исследований, посвященных поиску генетических маркеров для прогнозирования кардиотоксичности ХТ злокачественных новообразований лимфатической и кроветворной тканей.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Образование избыточного количества активных форм кислорода (АФК) в процессе метаболизма препаратов ХТ является наиболее распространенной гипотезой возникновения кардиотоксичности [16]. Изначальная высокая скорость окислительного метаболизма и недостаточная антиоксидантная способность сердечной ткани делают ее наиболее уязвимой к окислительному повреждению [19]. Считается, что основным источником АФК при лечении противоопухолевыми препаратами является ферментный комплекс НАДФН-оксидазы [20].

L. Wojnowski и соавт. впервые идентифицировали варианты генов (*NCF4*, *CYBA* и *RAC2*), кодирующих разные компоненты комплекса НАДФН-оксидазы, связанные с развитием кардиотоксичности (см. таблицу). У пациентов с неходжкинской лимфомой генотип AA варианта rs1883112 гена *NCF4*, кодирующего цитозольный фактор нейтрофилов 4 – регуляторный компонент НАДФН-оксидазы фагоцитов, – ассоциировался с развитием хронической формы кардиотоксичности, которая наблюдалась через 1 год после лечения (отношение шансов (ОШ) 2,5; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,3–5,0) [21]. Одно из последних исследований у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) показало, что наличие

аллеля А варианта rs1883112 связано со снижением ФВ ЛЖ (ОШ 16,43; 95 % ДИ 2,05–84,55; $p = 0,0001$) при терапии доксорубицином, при этом у 58 % пациентов с острой формой кардиотоксичности наблюдалось уменьшение ФВ ЛЖ (ниже 40 %), а у остальных больных она не превышала 55 % [22]. Также имеются данные о протективном действии генотипов AG/GG варианта rs1883112 в отношении кардиотоксичности II–IV степени (ОШ 0,37; 95 % ДИ 0,23–0,87; $p = 0,023$), наблюдаемом у пациентов с В-клеточными лимфомами, которые проходили лечение по программам R-CHOP-21 (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) [23].

Для генов цитохрома b-245 (*CYBA*), кодирующего легкую β -субъединицу p22phox НАДФН-оксидазы, и *RAC2*, кодирующего цитозольный белок, участвующий в активации НАДФН-оксидазы, было показано, что наличие аллеля Т варианта rs4673 гена *CYBA* и аллеля А варианта rs13058338 гена *RAC2* ассоциировано с развитием острой и хронической форм кардиотоксичности у пациентов с неходжкинской и CD20⁺-В-клеточной лимфомами [21, 24]. Влияние варианта rs13058338 гена *RAC2* на повышение риска развития кардиотоксичности также подтверждается исследованиями S.H. Armenian и соавт.: у больных лимфомами, лейкемией и множественной миеломой, перенесших трансплантацию гемопоэтических клеток, генотипы ТА/АА варианта rs13058338 связаны со снижением ФВ ЛЖ до 39 % (более чем на 10 % от исходного уровня до начала лечения) (ОШ 2,62; 95 % ДИ 1,46–4,69; $p = 0,02$) [25].

Еще одним важным участником окислительных процессов в клетках является оксидоредуктаза P450, кодируемая геном *POR*. Данный фермент катализирует восстановление хиноновой формы антрациклинов и их трансформацию в радикальную форму семихинона. Этот этап биологической активации стабилизирует перекрестное связывание доксорубина с ДНК и, как считается, значительно повышает цитотоксичность препарата [26]. Ассоциация с риском развития кардиотоксичности обнаружена для минорного аллеля G вариантов rs13240755 (ОШ 3,18; 95 % ДИ 1,22–8,27; $p = 0,01376$) и rs2868177 (ОШ 1,89; 95 % ДИ 0,7435–4,819; $p = 0,1756$) гена *POR* у пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Оба варианта были связаны со снижением ФВ ЛЖ более чем на 15 % от исходного уровня на фоне и после лечения ($p < 0,05$) [27].

Также считается, что накопление свободного железа в кардиомиоцитах усиливает окислительный стресс, индуцированный ХТ. Препараты антрициклинового ряда (доксорубин, даунорубин и др.) имеют высокое сродство к ионам железа, что приводит к образованию комплексов антрациклин – железо. Данные комплексы способствуют преобразованию относительно безопасных соединений $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 в более токсичные гидроксильные радикалы $\cdot OH$, которые повреждают ДНК, белки и липиды. Кроме того, применение антрациклинов приводит к увеличению

клеточного уровня железа за счет его мобилизации из ферритина, что также усиливает опосредованный железом окислительный стресс [28, 29].

Наличие наследственных заболеваний, связанных с избыточным накоплением ионов железа, также может усиливать кардиотоксичность, индуцированную ХТ. На сегодняшний день известны 2 варианта гена *HFE*, встречающиеся у лиц с наследственным гемохроматозом 1-го типа, ассоциированные с повышением риска развития кардиотоксичности [30].

A. Cascales и соавт. обнаружили связь между вариантами гена *HFE* (C282Y rs1799945 и H63D rs1800562) и сердечной дисфункцией у пациентов с солидными и гематологическими злокачественными новообразованиями. Высокое содержание железа в сердечной ткани обнаружилось у носителей гаплотипов C282Y-C/H63D-D ($p = 0,049$) и C282Y-Y/H63D-H ($p = 0,027$). Также у пациентов, получавших кумулятивную дозу доксорубина более 200 мг/м², концентрация железа в миокарде достоверно увеличивалась по сравнению с контрольной группой ($p = 0,01$). Однако в данном исследовании ни варианты гена *HFE*, ни гаплотипы не были ассоциированы с хронической сердечной недостаточностью [31]. Подтверждение влияния варианта rs1799945 (аллель G) гена *HFE* на повышение риска развития сердечной недостаточности получено в исследованиях S.H. Armenian и соавт.: у пациентов с лейкемией, множественной миеломой, неходжкинской и ходжкинской лимфомами наблюдалось снижение ФВ ЛЖ после лечения более чем на 10 % по сравнению с исходными уровнями этого показателя (ОШ 2,58; 95 % ДИ 1,27–5,20), а среднее значение ФВ ЛЖ составило 39 % [25]. Кроме того, в работе S.E. Lipshultz и соавт. у больных ОЛЛ гетерозиготность варианта rs1799945 гена *HFE* была связана с многократным повышением концентраций тропонина Т после терапии дексаметазоном (ОШ 7,23; 95 % ДИ 1,78–29,4; $p = 0,006$). У пациентов с аллельными вариантами (G) rs1799945 и/или (A) rs1800562 наблюдались значительно более низкие функция, масса и толщина задней стенки ЛЖ через 2 года после постановки диагноза по сравнению с пациентами, у которых данных вариантов не было [32].

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

Помимо механизмов образования избыточного количества АФК показана большая роль антиоксидантной системы сердца в патогенезе кардиотоксичности. Ферментативная антиоксидантная защита в сердце включает каталазу (CAT), глутатионпероксидазу (GSHPx), супероксиддисмутазу (SOD) и глутаредоксины (Grxs). Данные ферменты препятствуют накоплению избыточных АФК путем преобразования их в нетоксичные молекулы: фермент SOD2 метаболизирует образующиеся при окислении антрациклинов супероксидные радикалы до перекиси водорода, которая далее при помощи CAT преобразуется в воду [33].

Варианты генов, ассоциированные с риском возникновения кардиотоксичности, у пациентов с онкогематологическими заболеваниями
Genetic variants associated with cardiotoxicity in patients with oncohematological diseases

| Ген Gene | Вариант Variant | Аллель (генотип) Allele (genotype) | Риск кардио- токсичности Cardiotoxicity risk | <i>p</i> | Отношение шансов (95 % доверительный интервал) Odds ratio (95 % confidence interval) | Группа Group | Источник References |
|---|-------------------------|--|--|----------|--|--|------------------------|
| Полиморфизмы генов окислительного стресса Polymorphisms of oxidative stress | | | | | | | |
| <i>NCF4</i> | rs1883112 | A (AA) | Повышался Increased | – | 2,5 (1,3–5,0) | Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's lymphoma | [21] |
| | | G (AG/GG) | Снижался Decreased | 0,0001 | 16,4 (2,05–84,55) | ОЛЛ ALL | [22] |
| <i>СУВА</i> | rs4673 | T | Повышался Increased | 0,023 | 0,37 (0,23–0,87) | В-клеточная лимфома B-cell lymphoma | [23] |
| | | A | Снижался Decreased | – | 2,0 (1,0–3,9) | Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's lymphoma | [21] |
| <i>RAC2</i> | rs13058338 | A | Повышался Increased | 0,090 | 1,8 (0,9–3,6) | CD20 ⁺ -В-клеточная лимфома CD20 ⁺ -B-cell lymphoma | [24] |
| | | A (TA/AA) | Повышался Increased | – | 2,6 (1,3–5,1) | Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's lymphoma | [21] |
| <i>POR</i> | rs13240755 rs2868177 | G | Повышался Increased | 0,077 | 1,8 (0,9–3,7) | CD20 ⁺ -В-клеточная лимфома CD20 ⁺ -B-cell lymphoma | [24] |
| | | G | Повышался Increased | 0,02 | 2,6 (1,46–4,69) | Лейкемия, ММ, неходжкинская и ходжкинская лимфомы Leukemia, MM, Non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas | [25] |
| <i>HFE</i> | rs1799945 rs1800562 | G | Повышался Increased | 0,01376 | 3,2 (1,22–8,27) | ОМЛ AML | [27] |
| | | A | Повышался Increased | 0,1756 | 1,9 (0,74–4,81) | ОМЛ AML | [27] |
| | | | Повышался Increased | – | 2,6 (1,27–5,20) | Лейкемия, ММ, неходжкинская и ходжкин- ская лимфомы Leukemia, MM, Non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas | [25] |
| | | | Повышался Increased | 0,006 | 7,2 (1,78–29,4) | ОЛЛ ALL | [32] |
| | | | Повышался Increased | 0,006 | 7,2 (1,78–29,4) | ОЛЛ ALL | [32] |

Продолжение таблицы
Continuation of table

| Ген Gene | Вариант Variant | Алель (генотип) Allele (genotype) | Риск кардио- токсичности Cardiotoxicity risk | <i>p</i> | Отношение шансов (95 % доверительный интервал) Odds ratio (95 % confidence interval) | Группа Group | Источник References |
|--|--------------------|---|--|----------|--|---|------------------------|
| Полиморфизмы генов антиоксидантной защиты Polymorphisms of antioxidant defense | | | | | | | |
| <i>CAT</i> | rs10836235 | C (CC) | Повышался Increased | 0,307 | 3,2 (0,34–30,43) | ОЛЛ ALL | [34] |
| <i>GSTM1</i> | | «Нулевой» генотип Null genotype | Повышался Increased | 0,007 | 2,7 (1,3–5,9) | ОЛЛ, ОМЛ ALL, AML | [35] |
| <i>HAS3</i> | rs2232228 | A (AA) | Повышался Increased | 0,003 | 8,9 (2,1–37,5) | Лимфомы, ОЛЛ, ОМЛ Lymphomas, ALL, AML | [40] |
| <i>NQO1</i> | rs1043470 | T | Повышался Increased | 0,0582 | – | ОЛЛ ALL | [41] |
| Полиморфизмы генов метаболизма ксенобиотиков Polymorphisms of xenobiotic metabolism | | | | | | | |
| <i>CBR1</i> | rs1056892 | G (GG) | Повышался Increased | 0,09 | 1,5 (0,93–2,51) | ОЛЛ ALL | [44] |
| | rs9024 | A (AA) | Повышался Increased | <0,05 | 2,3 (1,31–4,07) | ОЛЛ ALL | [45] |
| | rs9024 | (GA) | Снижался Decreased | <0,05 | 0,6 (0,27–1,53) | ОЛЛ ALL | [45] |
| <i>CBR3</i> | rs1056892 | G (GG) | Повышался Increased | 0,02 | 1,8 (1,08–2,96) | ОЛЛ ALL | [44] |
| | | (AG) | | | | | |
| <i>ABCC1</i> | rs3743527 | T (TT) | Повышался Increased | 0,001 | – | ОЛЛ ALL | [47] |
| | rs246221 | T (ТС/ТТ) | Повышался Increased | 0,001 | – | ОЛЛ ALL | [47] |
| | rs45511401 | A | Повышался Increased | – | 3,6 (1,6–8,4) | Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's lymphoma | [21] |

Окончание таблицы
The end of table

| Ген Gene | Вариант Variant | Аллель (генотип) Allele (genotype) | Риск кардио- токсичности Cardiotoxicity risk | <i>p</i> | Отношение шансов (95 % доверительный интервал) Odds ratio (95 % confidence interval) | Группа Group | Источник References |
|---|--------------------|--|--|-----------------------|--|--|------------------------|
| Полиморфизмы генов метаболизма ксенобиотиков | | | | | | | |
| ABCC2 | rs8187710 | A | Повышался Increased | 0,02 | 5,2 (1,92–13,84) | Лейкемия, ММ, неходжкинская и ходжкинская лимфомы Leukemia, MM, Non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas | [25] |
| | rs3740066 | G (GG) | Повышался Increased | 0,0738 | – | ОЛЛ ALL | [41] |
| ABCC5 | rs7627754 | T (TT) | Повышался Increased | 0,002 | – | ОЛЛ ALL | [48] |
| | rs1128503 | G (GG) | Повышался Increased | 0,044 | 6,8 (1,08–42,73) | ОМЛ OML | [36] |
| ABCB1 | rs1128503 | (AA/GA) | Снижался Decreased | 0,044 | 0,1 (0,023–0,92) | ОМЛ OML | [36] |
| | rs4982753 | A | Снижался Decreased | 0,0078 | 0,5 (0,31–0,85) | ОЛЛ, ОМЛ, неходжкинская лимфома ALL, AML, Non-Hodgkin's lymphoma | [50] |
| SLC22A7 | rs4149178 | G | Снижался Decreased | 0,0034 | 0,4 (0,21–0,77) | ОЛЛ, ОМЛ, неходжкинская лимфома ALL, AML, Non-Hodgkin's lymphoma | [50] |
| SLC22A6 | rs6591722 | A (AA) | Повышался Increased | 0,0171 | – | ОЛЛ ALL | [41] |
| SLC28A3 | rs7853758 | A | Снижался Decreased | 0,000018 | 0,4 (0,21–0,59) | ОЛЛ, ОМЛ ALL, AML | [51] |
| Полиморфизмы генов, участвующих в регуляции транскрипции | | | | | | | |
| Polymorphisms in transcription regulation | | | | | | | |
| RARG | rs2229774 | A | Повышался Increased | $5,9 \times 10^{-10}$ | 5,2 (3,0–9,0) | ОЛЛ ALL | [53] |

Примечание. Риск развития кардиотоксичности оценивался по изменению показателей фракции выброса и фракции укорочения левого желудочка, уровню сывороточных тропонинов I или T и наличию нарушений со стороны сердечно-сосудистой системы (нарушения ритма, неспецифические нарушения реполяризации и блокада правой ножки пучка Гиса, диастолическая дисфункция левого желудочка и др.). ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ММ – множественная миелома.
Note. The risk of cardiotoxicity was assessed by changes in the ejection fraction and shortening fraction of the left ventricle, the level of serum troponins I or T and the presence of disorders of the cardiovascular system (rhythm disturbances, nonspecific repolarization disorders and blockage of the right leg of the His bundle, diastolic dysfunction of the left ventricle, etc.); ALL – acute lymphoblastic leukemia; AML – acute myeloid leukemia; MM – multiple myeloma.

Вклад полиморфных вариантов в модуляцию кардиотоксичности ХТ был изучен для генов, кодирующих ферменты *SOD2* (rs4880 гена *SOD2*), *CAT* (rs1001179 и rs10836235 гена *CAT*) и глутатион-S-дисмутазы («нулевой» генотип генов *GSTT1* и *GSTM1*). Так, у детей с ОЛЛ наблюдалась значимая ассоциация между генотипом *CC* варианта rs10836235 гена *CAT* и наличием изменений со стороны сердечно-сосудистой системы (нарушения ритма, неспецифические нарушения реполяризации и блокада правой ножки пучка Гиса, диастолическая дисфункция ЛЖ и др.) после воздействия антрациклинов (ОШ 3,22; 95 % ДИ 0,341–30,426; $p = 0,307$) [34]. Также была выявлена ассоциация между «нулевым» генотипом (делеция по двум аллелям) гена *GSTM1* и антрациклин-индуцированной кардиомиопатией у детей с ОЛЛ и ОМЛ. У пациентов с «нулевым» генотипом риск развития кардиомиопатии был в 2,7 раза выше (ОШ 2,7; 95 % ДИ 1,3–5,9; $p = 0,007$) по сравнению с пациентами с положительным генотипом *GSTM1* (–/+ или +/+) [35]. Статистически значимой корреляции между кардиотоксическими эффектами ХТ и вариантами генов *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs1001179), а также «нулевым» генотипом *GSTT1* у больных ОЛЛ и ОМЛ не обнаружено [34, 36].

Антиоксидантной активностью в тканях сердца обладает также гиалуроновая кислота [37], которая играет большую роль в поддержании целостности плазматической мембраны кардиомиоцитов при повреждающем действии АФК путем связывания через рецепторы адгезии CD44 [38, 39]. Обнаружено, что у пациентов с лимфомами, ОЛЛ и ОМЛ, подвергшихся воздействию высоких доз антрациклинов (>250 мг/м²), наличие генотипа AA варианта rs2232228 гена *HAS3* приводило к 9-кратному увеличению риска развития кардиомиопатии по сравнению с генотипом GG (ОШ 8,9; 95 % ДИ 2,1–37,5; $p = 0,003$) [40].

При обследовании детей с ОЛЛ ($n = 622$) и остеосаркомой ($n = 39$) были проанализированы данные эхокардиографии и различные варианты гена *NQO1*, кодирующего НАДФН-хинондегидрогеназу. Данный фермент участвует в защите от окислительного стресса, предотвращая образование нестабильных анион-радикалов. Пациенты с минорным Т-аллелем варианта rs1043470 имели значительно более низкие показатели фракции укорочения ЛЖ (ФУ ЛЖ) в фазе интенсивной ХТ ($p = 0,0428$) и через 5–10 лет после постановки диагноза ($p = 0,0582$) по сравнению с носителями С-аллеля [41].

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ

Считается, что наиболее значимое повреждающее действие на кардиомиоциты оказывают не сами препараты ХТ, а их вторичные метаболиты, поскольку они имеют более высокую скорость поступления в сердечную ткань и более низкую скорость выведения из нее [42]. Образование кардиотоксических метаболитов

в сердце катализируется карбонилредуктазой 1 (ABCC1) и карбонилредуктазой 3 (CBR3) [43]. У пациентов с ОЛЛ, получающих низкие и средние дозы (от 1 до 250 мг/м²) антрациклинов (доксорубин, дауномицин, эпирубицин, идарубин) с генотипом GG варианта rs1056892 гена *CBR3* риск развития кардиомиопатии был выше по сравнению с пациентами с генотипами GA и AA гена *CBR3*, не подвергавшимися воздействию антрациклинов (ОШ 1,79; 95 % ДИ 1,08–2,96; $p = 0,02$). При наличии комбинации генотипов *CBR1*: GG и *CBR3*: GG наблюдалось незначительное увеличение риска развития кардиомиопатии (ОШ 1,53; 95 % ДИ 0,93–2,51; $p = 0,09$) [44]. Роль варианта rs1056892 гена *CBR3* в модуляции риска возникновения кардиотоксичности подтвердилась в ходе исследований, в которые вошли дети с ОЛЛ. Было выявлено, что высокий риск развития этого нежелательного явления наблюдался у носителей генотипа AG (ОШ 9,91; 95 % ДИ 1,07–91,47; $p = 0,04$), при этом отмечалось снижение ФВ ЛЖ до 30–55 % при терапии доксорубином [22]. Также исследования показали, что у детей с ОЛЛ рецессивный генотип AA варианта rs9024 гена *CBR1* связан с повышением риска возникновения кардиотоксичности (ОШ 2,31; 95 % ДИ 1,31–4,07; $p \leq 0,05$), при этом наличие генотипа GA оказывало протективное действие (ОШ 0,64; 95 % ДИ 0,27–1,53; $p \leq 0,05$) [45].

Ведущую роль в транспорте препаратов через плазматическую мембрану клеток играют АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ABC-транспортеры), способные модулировать токсичность некоторых препаратов [46]. Как показали исследования, полиморфизмы генов ABC-транспортеров, включая *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5* и *ABCB1*, связаны как с повышенным риском развития сердечной недостаточности, так и с протективным действием при терапии антрациклинами у детей и взрослых с онкогематологическими заболеваниями [21, 25, 36, 41, 47, 48].

Роль полиморфизмов гена *ABCC1*, также известного как ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью белок 1 (MRP1), в развитии кардиотоксичности ХТ была изучена у пациентов с ОЛЛ. А. F. Semsei и соавт. показали, что варианты rs246221 и rs3743527 влияют на антрациклин-индуцированную дисфункцию ЛЖ. Так, генотип ТТ rs3743527 гена *ABCC1* и комбинация генотипов ТТ rs3743527 и ТС/ТТ rs246221 связаны с самыми низкими показателями ФУ ЛЖ после проведения ХТ ($p = 0,001$) [47]. В исследовании L. Wojnowski и соавт. у пациентов с неходжкинской лимфомой, проходивших лечение доксорубином, наличие аллеля А варианта rs45511401 гена *ABCC1* ассоциировалось с развитием острой кардиотоксичности (ОШ 3,6; 95 % ДИ 1,6–8,4) [21].

Еще одним важным представителем ABC-транспортеров, связанных с кардиотоксичностью ХТ, является ген *ABCC2*. У пациентов с гемобластомами, перенесших трансплантацию гемопоэтических клеток, наличие аллеля А варианта rs8187710 коррелировало

с повышением риска развития антрациклин-опосредованной кардиотоксичности (ОШ 5,22; 95 % ДИ 1,92–13,84, $p = 0,02$) [25]. Согласно результатам другого исследования, у пациентов с ОЛЛ генотип GG варианта rs3740066 гена *ABCC2* ассоциируется с более низкими показателями ФУ ЛЖ во время фазы интенсивной ХТ и через 5–10 лет после постановки диагноза ($p = 0,0738$ и $p = 0,00711$ соответственно) [41].

Связь с развитием кардиотоксических эффектов препаратов ХТ также показана для полиморфизмов гена *ABCC5*. У пациентов с ОЛЛ, проходивших лечение доксорубицином, наблюдалось значительное снижение ФВ ($p < 0,0001$) и ФУ ($p = 0,002$) ЛЖ у носителей генотипа TT варианта rs7627754 (на 8–12 %) [48].

L. K. Yunis и соавт. при обследовании детей с ОМЛ установили, что генотип GG варианта rs1128503 гена *ABCB1*, кодирующего клеточный трансмембранный транспортер Р-гликопротеин, связан с повышенным риском развития кардиотоксичности (ОШ 6,8; 95 % ДИ 1,08–42,73; $p = 0,044$), при этом генотипы AA и GA, напротив, были идентифицированы как фактор защиты от развития кардиотоксичности (ОШ 0,14; 95 % ДИ 0,023–0,92; $p = 0,044$) [36].

Было показано, что катионные SLC-транспортеры семейства *SLC22B* также включены в метаболизм ксенобиотиков в качестве переносчиков антрациклинов [49]. Роль в модуляции риска кардиотоксичности изучена для вариантов генов *SLC22A17* и *SLC22A7*: наличие минорного аллеля А варианта rs4982753 гена *SLC22A17* (ОШ 0,52; 95 % ДИ 0,31–0,85; $p = 0,0078$) и минорного аллеля G варианта rs4149178 гена *SLC22A7* (ОШ 0,41; 95 % ДИ 0,21–0,77; $p = 0,0034$) было ассоциировано с протективным действием в отношении антрациклин-индуцированной кардиотоксичности [50]. J. C. Sági и соавт. обнаружили, что генотип AA варианта rs6591722 гена *SLC22A6* связан со снижением ФУ ЛЖ у пациентов с ОЛЛ через 5–10 лет после постановки диагноза ($37,5 \pm 0,9$ %; $p = 0,0171$) [41]. Также имеются данные об ассоциации варианта rs7853758 гена *SLC28A3* с антрациклин-индуцированной кардиотоксичностью у пациентов с ОЛЛ и ОМЛ: минорный аллель А обладал протективным действием (ОШ 0,35; 95 % ДИ 0,21–0,59; $p = 0,000018$) [51].

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

Более поздние работы показали, что механизм развития кардиотоксичности, индуцированной ХТ, основан на ингибировании повреждений ДНК, опосредованных Top2 β . Основной функцией фермента Top2 является разматывание нитей ДНК во время репликации и транскрипционной рекомбинации для предотвращения гибели клеток. Антрациклины способны к образованию тройного комплекса Top2–антраци-

клин–ДНК, который вызывает нарушение нормального каталитического цикла Top2 β , что приводит к образованию двухцепочечных разрывов ДНК, апоптозу клеток и нарушению процессов транскрипции с последующей дисфункцией митохондрий и образованием АФК [52].

В исследовании с использованием метода полногеномного поиска ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) у пациентов с ОЛЛ обнаружен связанный с кардиотоксичностью вариант rs2229774 гена *RARG*, при наличии которого наблюдалось 5-кратное увеличение риска развития сердечно-сосудистых осложнений после завершения ХТ (ОШ 5,2; 95 % ДИ 3,0–9,0; $p = 5,9 \times 10^{-10}$). Ген *RARG* кодирует гамма-рецептор ретиноевой кислоты (retinoic acid receptor, RAR); считается, что данный ген подавляет экспрессию гена *Top2 β* . При этом у носителей варианта rs2229774 гена *RARG*, напротив, наблюдалась дерепрессия гена *Top2 β* в сердечной ткани и, как следствие, высокие базальные уровни Top2 β , что предположительно обуславливает повышенную чувствительность кардиомиоцитов к токсическому действию антрациклинов [53, 54].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные схемы лечения и диагностика осложнений ХТ существенно улучшили прогноз выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями лимфатической и кроветворной тканей. Вместе с тем наличие побочных эффектов лекарственной терапии и их своевременное прогнозирование с целью персонализации лечения до сих пор остаются актуальными проблемами онкогематологии. Рассмотренные в данном обзоре исследования указывают на то, что генетические особенности пациентов могут выступать в качестве прогностических маркеров риска развития кардиотоксичности, индуцированной ХТ онкогематологических заболеваний. Внедрение в клиническую практику определения вариантов генов, ассоциированных с рисками возникновения этого нежелательного явления, позволит повысить эффективность терапии за счет оптимизации схемы лечения и своевременного назначения кардиопротекторных препаратов. Необходимо отметить, что описанные молекулярно-генетические прогностические факторы применимы только для пациентов онкогематологического профиля без сопутствующей сердечно-сосудистой патологии, поскольку наличие ее признаков служит критерием исключения из исследования. Вместе с тем у многих больных, получающих ХТ, встречаются коморбидные состояния. Особенно это касается пациентов пожилого возраста, большинство из которых имеют сопутствующие заболевания сердечно-сосудистой системы. Таким образом, требуются дальнейшие исследования на более широкой когорте больных с учетом коморбидных состояний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Deo S.V.S., Sharma J., Kumar S. GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden: challenges and opportunities for surgical oncologists. *Ann Surg Oncol* 2022;29(11):6497–500. DOI: 10.1245/s10434-022-12151-6
- Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. The state of oncological care to the population of Russia in 2021. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskii, A.O. Shakhzadova. Moscow: P.A. Herzen Institute of Medical Research – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2022. 239 p. (In Russ.).
- Яндиева Р.А., Сарибекян Э.К., Мамедов М.Н. Кардиотоксичность при лечении онкологических заболеваний. *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний* 2018;6(17):3–11. Yandieva R.A., Saribekyan E.K., Mamedov M.N. Cardiotoxicity of cancer therapy. *Mezhdunarodnyj zhurnal serdca i sosudistyh zabolovanij* = International Journal of Heart and Vascular Diseases 2018;6(17):3–11. (In Russ.).
- Кузьмина Т.П., Давыдкин И.Л., Терешина О.В. и др. Кардиотоксичность и методы ее диагностики у пациентов гематологического профиля (обзор литературы). *Сибирский научный медицинский журнал* 2019;39(1):34–42. DOI: 10.15372/SSMJ20190105 Kuzmina T.P., Davydkin I.L., Tereshina O.V. et al. Cardiotoxicity and methods of its diagnosis in hematological patients (literature review). *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = Siberian Scientific Medical Journal 2019;39(1):34–42. (In Russ.). DOI: 10.15372/SSMJ20190105
- Вишня М.В., Агеев Ф.Т., Гиляров М.Ю. и др. Практические рекомендации по коррекции кардиоваскулярной токсичности противоопухолевой лекарственной терапии. *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO* 2021;11(41):66–87. DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-3s2-41 Vitsenia M.V., Ageev F.T., Giliarov M.Yu. et al. Practical recommendations for the correction of cardiovascular toxicity of antitumor drug therapy. *Zlokachestvennye opuholi: Prakticheskie rekomendacii RUSSCO* = Malignant Tumors: Practical Recommendations RUSSCO 2021;11(41):66–87. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2021-11-3s2-41
- Plana J.C., Galderisi M., Barac A. et al. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27(9):911–39. DOI: 10.1016/j.echo.2014.07.012
- Гиматдинова Г.Р., Данилова О.Е., Давыдкин И.Л. и др. Современные аспекты ранней диагностики кардиотоксических осложнений лекарственной терапии в онкологии (обзор литературы). *Клиническая онкогематология* 2022;15(1):107–13. DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-1-107-113 Gimatdinova G.R., Danilova O.E., Davydkin I.L. et al. Modern aspects of early diagnosis of cardiotoxic complications of drug therapy in oncology (literature review). *Klinicheskaya onkogematologiya* = Clinical Oncohematology 2022;15(1):107–13. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-1-107-113
- Anqi Y., Yu Z., Mingjun X. et al. Use of echocardiography to monitor myocardial damage during anthracycline chemotherapy. *Echocardiography* 2019;36(3):495–502. DOI: 10.1111/echo.14252
- Васюк Ю.А., Гендлин Г.Е., Емелина Е.И. и др. Согласованное мнение российских экспертов по профилактике, диагностике и лечению сердечно-сосудистой токсичности противоопухолевой терапии. *Российский кардиологический журнал* 2021;26(9):152–233. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4703 Vasyuk Yu.A., Gendlin G.E., Emelina E.I. et al. Consensus statement of Russian experts on the prevention, diagnosis and treatment of cardiotoxicity of anticancer therapy. *Rossiiskij kardiologicheskij zhurnal* = Russian Journal of Cardiology 2021;26(9):152–233. (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4703
- Гиматдинова Г.Р., Данилова О.Е., Давыдкин И.Л. и др. Генетические полиморфизмы, ассоциированные с развитием аритмического типа сердечно-сосудистых событий. *Российский кардиологический журнал* 2022;27(3S):101–7. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-5069 Gimatdinova G.R., Danilova O.E., Davydkin I.L. et al. Genetic polymorphisms associated with the development of arrhythmic type of cardiovascular events. *Rossiiskij kardiologicheskij zhurnal* = Russian Journal of Cardiology 2022;27(3S):101–7. (In Russ.). DOI: 10.15829/1560-4071-2022-5069
- Li Q., Du Q. Associations between nine candidate genetic polymorphisms with coronary heart disease: a meta-analysis. *Herz* 2020;45(1):15–28. DOI: 10.1007/s00059-019-4806-7
- Lyon A.R., López-Fernández T., Couch L.S. et al. ESC Scientific Document Group. 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2022;(10):333–465. DOI: 10.1093/ehjci/jeac106
- Yang X., Li G., Yang T. et al. Possible susceptibility genes for intervention against chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2020;(2020):4894625. DOI: 10.1155/2020/4894625
- Cardinale D., Iacopo F., Cipolla C.M. Cardiotoxicity of anthracyclines. *Front Cardiovasc Med* 2020;7:26. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00026
- Cappetta D., Rossi F., Piegari E. et al. Doxorubicin targets multiple players: a new view of an old problem. *Pharmacol Res* 2018;(127):4–14. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.03.016
- Ding Y., Du K., Niu Y.J. et al. Genetic susceptibility and mechanisms underlying the pathogenesis of anthracycline-associated cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2022;(2022):5818612. DOI: 10.1155/2022/5818612
- Kim Y., Seidman J.G., Seidman C.E. Genetics of cancer therapy-associated cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 2022;(167):85–91. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2022.03.010
- Linschoten M., Teske A.J., Cramer M.J. et al. Chemotherapy-related cardiac dysfunction: a systematic review of genetic variants modulating individual risk. *Circ Genom Precis Med* 2018;11(1):e001753. DOI: 10.1161/CIRCGEN.117.001753
- Songbo M., Lang H., Xinyong C. et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* 2019;1(307):41–8. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.02.013
- Xiao W., Wang R.S., Handy D.E. et al. NAD(H) and NADP(H) redox couples and cellular energy metabolism. *Antioxid Redox Signal* 2018;28(3):251–72. DOI: 10.1089/ars.2017.7216
- Wojnowski L., Kulle B., Schirmer M. et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2005;112(24):3754–62. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576850
- Gándara-Mireles J.A., Lares-Asseff I., Reyes Espinoza E.A. et al. Association of genetic polymorphisms NCF4 rs1883112, CBR3 rs1056892, and ABCC1 rs3743527 with the cardiotoxic effects of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics* 2021;31(5):108–15. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000428

23. Rossi D., Rasi S., Franceschetti S. et al. Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21. *Leukemia* 2009;23:1118–26. DOI: 10.1038/leu.2008.398
24. Reichwagen A., Ziepert M., Kreuz M. et al. Association of NADPH oxidase polymorphisms with anthracycline-induced cardiotoxicity in the RICOVER-60 trial of patients with aggressive CD20(+) B-cell lymphoma. *Pharmacogenomics* 2015;16(4):361–72. DOI: 10.2217/pgs.14.179
25. Armenian S.H., Ding Y., Mills G. et al. Genetic susceptibility to anthracycline-related congestive heart failure in survivors of haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 2013;163(2):205–13. DOI: 10.1111/bjh.12516
26. Fatunde O.A., Brown S.A. The role of CYP450 drug metabolism in precision cardio-oncology. *Int J Mol Sci* 2020;21(2):604. DOI: 10.3390/ijms21020604
27. Lubieniecka J.M., Graham J., Heffner D. et al. A discovery study of daunorubicin induced cardiotoxicity in a sample of acute myeloid leukemia patients prioritizes P450 oxidoreductase polymorphisms as a potential risk factor. *Front Genet* 2013;4:231. DOI: 10.3389/fgene.2013.00231
28. Gammella E., Maccarinelli F., Buratti P. et al. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 2014;5:25. DOI: 10.3389/fphar.2014.00025
29. Christidi E., Brunham L.R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis* 2021;12(4):339. DOI: 10.1038/s41419-021-03614-x
30. Neghina A.M., Anghel A. Hemochromatosis genotypes and risk of iron overload—A meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2011;21:1–14. DOI: 10.1016/j.annepidem.2010.05.013
31. Cascales A., Sánchez-Vega B., Navarro N. et al. Clinical and genetic determinants of anthracycline-induced cardiac iron accumulation. *Int J Cardiol* 2012;154(3):282–6. DOI: 10.1016/j.ijcard.2010.09.046
32. Lipshultz S.E., Lipsitz S.R., Kutok J.L. et al. Impact of hemochromatosis gene mutations on cardiac status in doxorubicin-treated survivors of childhood high-risk leukemia. *Cancer* 2013;119(19):3555–62. DOI: 10.1002/cncr.28256
33. Sangweni N.F., Gabuza K., Huisamen B. et al. Molecular insights into the pathophysiology of doxorubicin-induced cardiotoxicity: a graphical representation. *Arch Toxicol* 2022;96(6):1541–50. DOI: 10.1007/s00204-022-03262-w
34. Rajić V., Aplenc R., Debeljak M. et al. Influence of the polymorphism in candidate genes on late cardiac damage in patients treated due to acute leukemia in childhood. *Leuk Lymphoma* 2009;50(10):1693–8. DOI: 10.1080/10428190903177212
35. Singh P., Wang X., Hageman L. et al. Association of GSTM1 null variant with anthracycline-related cardiomyopathy after childhood cancer—A Children’s Oncology Group ALTE03N1 report. *Cancer* 2020;126(17):4051–8. DOI: 10.1002/cncr.32948
36. Yunis L.K., Linares-Ballesteros A., Aponte N. et al. Pharmacogenetics of ABCB1, CDA, DCK, GSTT1, GSTM1 and outcomes in a cohort of pediatric acute myeloid leukemia patients from Colombia. *Cancer Rep (Hoboken)* 2023;6(3):e1744. DOI: 10.1002/cnr2.1744
37. Young I.S., Woodside J.V. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54(3):176–86. DOI: 10.1136/jcp.54.3.176
38. Law C.H., Li J.M., Chou H.C. et al. Hyaluronic acid-dependent protection in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. *Toxicology* 2013;303:54–71. DOI: 10.1016/j.tox.2012.11.006
39. Toole B.P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):528–39. DOI: 10.1038/nrc1391
40. Wang X., Liu W., Sun C.L. et al. Hyaluronan synthase 3 variant and anthracycline-related cardiomyopathy: a report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2014;32(7):647–53. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.3557
41. Sági J.C., Egyed B., Kelemen A. et al. Possible roles of genetic variations in chemotherapy related cardiotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia and osteosarcoma. *BMC Cancer* 2018;18(1):704. DOI: 10.1186/s12885-018-4629-6
42. Carrasco R., Castillo R.L., Gormaz J.G. et al. Role of oxidative stress in the mechanisms of anthracycline-induced cardiotoxicity: effects of preventive strategies. *Oxid Med Cell Longev* 2021;2021:8863789. DOI: 10.1155/2021/8863789
43. Mordente A., Meucci E., Martorana G.E. et al. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. *IUBMB Life* 2001;52(1–2):83–8. DOI: 10.1080/15216540252774829
44. Blanco J.G., Sun C.L., Landier W. et al. Anthracycline-related cardiomyopathy after childhood cancer: role of polymorphisms in carbonyl reductase genes – a report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012;30(13):1415–21. DOI: 10.1200/JCO.2011.34.8987
45. Aslam S., Ameer S., Shabana N.A. et al. Pharmacogenetics of induction therapy-related toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia patients treated with UKALL 2003 protocol. *Sci Rep* 2021;11(1):23757. DOI: 10.1038/s41598-021-03208-9
46. Uddin M.E., Moseley A., Hu S. et al. Contribution of membrane transporters to chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2022;130(1):36–47. DOI: 10.1111/bcpt.13635
47. Semsei A.F., Erdelyi D.J., Ungvari I. et al. ABCC1 polymorphisms in anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Biol Int* 2012;36(1):79–86. DOI: 10.1042/CBI20110264
48. Krajinovic M., Elbared J., Drouin S. et al. Polymorphisms of ABCC5 and NOS3 genes influence doxorubicin cardiotoxicity in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 2016;16(6):530–5. DOI: 10.1038/tpj.2015.63
49. Magdy T., Jouni M., Kuo H.H. et al. Identification of drug transporter genomic variants and inhibitors that protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2022;145(4):279–94. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.055801
50. Visscher H., Rassekh S.R., Sandor G.S. et al. Genetic variants in SLC22A17 and SLC22A7 are associated with anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Pharmacogenomics* 2015;16(10):1065–76. DOI: 10.2217/pgs.15.61
51. Visscher H., Ross C.J., Rassekh S.R. et al. Pharmacogenomic prediction of anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *J Clin Oncol* 2012;30(13):1422–8. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.3467
52. Kalyanaraman B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol* 2020;29:101394. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101394
53. Aminkeng F., Bhavsar A.P., Visscher H. et al. A coding variant in RARG confers susceptibility to anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood cancer. *Nat Genet* 2015;47(9):1079–84. DOI: 10.1038/ng.3374
54. Niederreither K., Dollé P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 2008;9(7):541–53. DOI: 10.1038/nrg2340

Вклад авторов

Ю.С. Милюткина: обзор литературы, написание текста статьи;
А.С. Сустретов, Л.В. Лимарева: редактирование.

Authors' contribution

Yu.S. Milyutkina: literature review, writing the text of the article;
A.S. Sustretov, L.V. Limareva: editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Ю.С. Милюткина / Yu.S. Milyutkina: <https://orcid.org/0000-0002-9258-9275>

А.С. Сустретов / A.S. Sustretov: <https://orcid.org/0000-0002-3021-2130>

Л.В. Лимарева / L.V. Limareva: <https://orcid.org/0000-0003-4529-5896>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-97-107>

Анализ экспрессии матричной РНК панели генов морфологически неизмененного эпителия прямой кишки как метод ранней диагностики патологии толстой кишки

В.К. Боженко¹, С.В. Гончаров¹, М.В. Захаренко¹, Я.Ю. Киселева¹, Т.А. Кармакова², Т.М. Кулинич¹,
У.С. Станоевич³, Н.В. Мельникова¹, А.Л. Сенчукова¹, И.Б. Грунин¹, О.П. Близнюков¹, В.А. Солодкий¹

¹ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86;

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

³ОБУЗ «Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островерхова»; Россия, 305524 Курская обл., Курский район, Рышковский с/с, хутор Кислино, ул. Елисеева, 1

Контакты: Владимир Константинович Боженко vbojenko@mail.ru

Введение. Отсутствие специфических клинических симптомов на ранних стадиях развития колоректального рака приводит к тому, что четверть пациентов, впервые обращающихся за помощью, имеют метастатическую стадию заболевания. Для своевременного обнаружения предопухолевых нарушений или скрытых очагов малигнизации сегодня активно изучаются возможности современных молекулярно-биологических технологий.

Цель исследования – разработка метода диагностики опухолевых заболеваний толстой кишки на основе молекулярно-генетического анализа морфологически неизмененного кишечного эпителия, отдаленного от очага опухолевого поражения.

Материалы и методы. Исследован профиль экспрессии матричной РНК (мРНК) 63 генов-кандидатов, потенциально связанных с патогенезом неопластических изменений, в образцах слизистой оболочки прямой кишки. Образцы получены в ходе профилактической и/или диагностической видеокколоноскопии 122 пациентов, из которых у 41 в анамнезе не было заболеваний толстой кишки (группа «Норма»), у 32 – установлен диагноз «полипы толстой кишки» (группа «Полипоз»), у 49 – диагноз «карцинома толстой кишки» (группа «Колоректальный рак»). Экспрессию мРНК оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. С помощью дискриминантного анализа установлено, что клеточный материал соскобов из прямой кишки в группе колоректального рака достоверно, с точностью выше 96 %, отличается по экспрессионному фенотипу от групп нормы и полипоза.

Заключение. Полученные данные являются предпосылкой к разработке малоинвазивного метода диагностики, который может быть использован в рамках амбулаторного обследования для оценки риска наличия опухолевого заболевания толстой кишки.

Ключевые слова: экспрессия генов, матричная РНК, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, неизменная слизистая оболочка толстой кишки, скрининг колоректального рака, диагностика колоректального рака

Для цитирования: Боженко В.К., Гончаров С.В., Захаренко М.В. и др. Анализ экспрессии матричной РНК панели генов морфологически неизмененного эпителия прямой кишки как метод ранней диагностики патологии толстой кишки. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):97–107. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-97-107>

Analysis of the expression of matrix RNA of a panel of genes of morphologically unchanged rectal epithelium as a method of early diagnosis of colon pathology

V.C. Bozhenko¹, S.V. Goncharov¹, M.V. Zakharenko¹, Ya. Yu. Kiseleva¹, T.A. Karmakova², T.M. Kulinich¹, U.S. Stanoevich³,
N.V. Melnikova¹, A.L. Senchukova¹, I.B. Grunin¹, O.P. Bliznyukov¹, V.A. Solodky¹

¹Russian Scientific Center of Roentgenoradiology; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia;

²P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinsky Proezd, Moscow 125284, Russia;

³G.E. Ostroverkhov Kursk Oncology Research and Clinical Center; 1 Eliseeva St., Kislino Hutor, Ryshkovsky s/s, Kursk Region, Kursk District 305524, Russia

Contacts: Vladimir Konstantinovich Bozhenko vbojenko@mail.ru

Introduction. The absence of specific clinical symptoms in the early stages of colorectal cancer development leads to the fact that a quarter of patients who seek help for the first time have a metastatic stage of the disease. For the timely detection of pre-tumor disorders or hidden foci of malignancy, the possibilities of modern molecular biological technologies are being actively studied today.

Aim. To develop a method for diagnosing tumor diseases of the colon based on molecular genetic analysis of morphologically unchanged intestinal epithelium distant from the focus of the tumor lesion.

Materials and methods. We examined the matrix RNA (mRNA) expression profile of 63 candidate genes potentially associated with the pathogenesis of neoplastic changes in rectal mucosal samples. Samples were obtained during prophylactic and/or diagnostic video colonoscopy of 122 patients, 41 of whom had no history of breast cancer ("Normal"), 32 patients were diagnosed with breast cancer polyps ("Polyposis") and 49 patients were diagnosed with breast cancer ("Colorectal cancer"). mRNA expression was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. Using the discriminant analysis method, it was established that the cellular material of scrapings from the rectum in the "Colorectal cancer" group reliably, with a classification accuracy above 96 %, differs in expression phenotype from the "Normal" and "Polyposis" groups.

Conclusion. The data obtained are a prerequisite for the development of a minimally invasive diagnostic method that can be used as part of an outpatient examination to assess the risk of colon tumor disease.

Keywords: gene expression, matrix RNA, reverse transcription polymerase chain reaction, unchanged colon mucosa, colorectal cancer screening, diagnosis of colorectal cancer

For citation: Bozhenko V.C., Goncharov S.V., Zakharenko M.V. et al. Analysis of the expression of matrix RNA of a panel of genes of morphologically unchanged rectal epithelium as a method of early diagnosis of colon pathology. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):97–107. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-97-107>

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одной из главных причин онкологической заболеваемости и смертности во всем мире. При своевременной ранней диагностике 5-летняя выживаемость достигает 90 %. Однако КРР диагностируется на I и II стадиях менее чем в 40 % случаев, что объясняет высокую смертность и низкие показатели безрецидивной выживаемости. Разработка и совершенствование методов лечения данной патологии способствуют снижению смертности и увеличению продолжительности жизни [1, 2]. Внедрение в ряде стран программ скрининга, включающих методы эндоскопической диагностики и исследование кала на скрытую кровь, позволило добиться снижения темпов роста заболеваемости КРР, повысить выявляемость этого злокачественного новообразования на ранних стадиях. Однако отсутствие специфических клинических симптомов опухолевого поражения толстой кишки (ТК) на ранних стадиях часто является причиной поздней диагностики заболевания, вследствие чего показатели смертности и безрецидивной выживаемости остаются неизменными на протяжении последних 10 лет [2].

Классические сывороточные маркеры, такие как раковый эмбриональный антиген и СА19–9, сегодня применяются для мониторинга больных КРР после лечения, однако их значимость для ранней диагностики опухоли невелика [3, 4]. Объективная сложность выполнения эндоскопического исследования при профилактических обследованиях и недостаточные чувствительность и специфичность лабораторных

тестов делают крайне востребованным появление новых информативных методов выявления данной патологии [3].

В настоящее время ведется активный поиск биологических маркеров, ассоциированных с КРР, доступных для определения в крови или содержимом кишечника. В число маркеров-кандидатов входят некоторые соматические мутации и зоны метилирования ДНК, некодирующие РНК, белки, регулирующие процессы пролиферации, адгезии и неоангиогенеза, аутоантитела, цитокины, метаболиты и состав микробиома [5]. Современный уровень развития молекулярно-биологических технологий, накопленные знания о молекулярном патогенезе КРР, ставшее рутинным использование молекулярно-генетических методов анализа в клинической практике создают многообещающие предпосылки для развития этого направления.

Необходимо подчеркнуть, что хотя КРР — одно из наиболее изучаемых злокачественных новообразований, механизмы возникновения его спорадических форм еще далеки от понимания. Нацеленность на обнаружение предопуховых изменений или скрытых очагов малигнизации обуславливает интерес к изучению морфологически неизменной слизистой оболочки, как перитуморальной, так и располагающейся на удалении от опухоли [6, 7]. Фенотипические (молекулярные) особенности, обнаруживаемые в неизменных тканях, могут являться предикторами злокачественной трансформации или способствовать прогрессированию патологических нарушений [8, 9]. Ранее было показано, что по данным молекулярно-генетического

и транскриптомного анализов морфологически нормальный эпителий ТК больных КРР отличается от кишечного эпителия здоровых лиц и пациентов с полипами или колитом [10]. Эти результаты нашли подтверждение в работах других авторов [11]. Изменения, регистрируемые в здоровой слизистой оболочке при развитии онкологического процесса, затрагивают самые разные функциональные характеристики ткани: от пролиферации и метаболизма клеток до активности провоспалительных сигналов [12–14]. Таким образом, сведения, полученные при анализе морфологически неизмененных тканей пораженного органа, могут быть основой для поиска новых методов диагностики патологического процесса. Ранее было показано, что при развитии КРР молекулярные изменения в морфологически неизмененном эпителии обнаруживаются во всех отделах ТК, однако наибольший интерес с точки зрения диагностики представляют те, что происходят в прямой кишке (ПК) [15]. Клеточный материал слизистой ПК человека является наиболее доступным, поскольку существует возможность малоинвазивного способа его получения в виде соскоба при ректальном исследовании, что в дальнейшем может существенно облегчить разработку диагностического метода.

Цель исследования – разработка метода диагностики заболеваний ТК на основе молекулярно-генетического анализа морфологически неизмененного эпителия ПК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнен сравнительный анализ профилей экспрессии генов в клеточном материале соскобов ($n = 122$) морфологически неизмененной слизистой оболочки ПК у лиц без патологии ТК, пациентов с полипами ТК и установленным диагнозом КРР.

В исследование включены образцы пациентов, проходивших обследование и лечение в Российском научном центре рентгенодиагностики ($n = 91$) и Курском онкологическом научно-клиническом центре им. Г.Е. Островерхова ($n = 31$) с 2018 по 2019 г. У 49 больных был морфологически подтвержденный диагноз «аденокарцинома ТК», у 32 – гиперпластические и аденоматозные полипы ТК, у 41 – не выявлено гиперпролиферативной или воспалительной патологии ТК и онкологических заболеваний в анамнезе. Для анализа использовали материал соскобов, взятых со слизистой оболочки ПК в ходе профилактической и/или диагностической видеокOLONоскопии. Мазки брали с помощью уrogenитального зонда типа D «Цитощетка» из ампулярного отдела ПК на расстоянии 6–10 см от ануса.

Были сформированы 3 группы: в 1-ю вошли пациенты со злокачественными новообразованиями ободочной кишки и ПК (группа «КРР»), во 2-ю – с доброкачественной гиперпролиферативной патологией ТК (группа «Полипоз»), в 3-ю – без патологии ТК (группа

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов с колоректальным раком и полипозом

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with colorectal cancer and polyposis

| Характеристика Characteristic | Частота случаев, % Frequency of cases, % |
|---|---|
| Колоректальный рак Colorectal cancer | |
| Стадия заболевания: Disease stage: | |
| I | 13,3 |
| II | 24,5 |
| III | 31,1 |
| IV | 31,1 |
| Степень распространенности первичной опухоли: Degree of prevalence of the first tumor: | |
| T1 | 4,4 |
| T2 | 8,9 |
| T3 | 68,9 |
| T4 | 17,8 |
| Наличие лимфогенных метастазов: Presence of lymphogenous metastases: | |
| N0 | 46,6 |
| N1–3 | 53,4 |
| Наличие отдаленных метастазов: Presence of distant metastases: | |
| M0 | 68,9 |
| M1 | 31,1 |
| Степень злокачественности опухоли: Tumor grade: | |
| G ₁ | 59,1 |
| G ₂ | 22,7 |
| G ₃ | 4,5 |
| не оценивалась not assessed | 13,7 |
| Полипоз Polyposis | |
| Тип полипа: Polyp type: | |
| гиперпластический полип hyperplastic polyp | 35,5 |
| тубулярная аденома tubular adenoma | 29 |
| тубуловорсинчатая аденома tubulovillous adenoma | 22,6 |
| зубчатый полип serrated polyp | 12,9 |
| Степень дисплазии: Dysplasia grade: | |
| без дисплазии without dysplasia | 31,8 |
| легкая lightweight | 36,4 |
| умеренная moderate | 13,6 |
| тяжелая heavy | 18,2 |

«Норма»). Средний возраст больных группы «КРР» (39 % женщин, 61 % мужчин) составил $65,9 \pm 10,3$ года, группы «Полипоз» (37,5 % женщин, 62,5 % мужчин) – $62,1 \pm 11,4$ года, группы «Норма» (87,8 % женщин, 12,2 % мужчин) – $54,5 \pm 13,3$ года.

Диагноз установлен по данным клинических, инструментальных и морфологических методов исследования. Стадия КРР определена по международной классификации Tumor, Nodus and Metastasis. Клинико-морфологическая характеристика пациентов с КРР и полипозом представлена в табл. 1, а локализация патологического процесса в отделах кишечника у больных КРР и с полипами ТК – в табл. 2. В связи с небольшим количеством образцов из проксимальных отделов ТК при локализации патологического процесса в печеночном углу и восходящем отделе образцы объединили в группу «Восходящий отдел», при расположении опухоли в селезеночном углу и нисходящем отделе – в группу «Нисходящий отдел» (см. табл. 2).

Таблица 2. Распределение образцов в группах в зависимости от локализации доброкачественного и злокачественного опухолевого поражения толстой кишки

Table 2. Distribution of samples in groups depending on the location of benign and malignant tumor lesions of the colon

| Отдел толстой кишки Colon section | Полипы, абс. (n = 32) Polyps, abs. (n = 32) | Колоректальный рак, абс. (n = 49) Colorectal cancer, abs. (n = 49) |
|--------------------------------------|---|---|
| Восходящий Rising | 6 | 10 |
| Нисходящий Descending | 5 | 6 |
| Сигмовидный Sigmoid | 6 | 14 |
| Прямая кишка Rectum | 15 | 19 |

Образцы клеточного материала помещали в стабилизирующий РНК раствор Ever Fresh RNA («Клоноген», Россия). Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. РНК элюировали в 100 мкл DEPC-обработанной воды. Концентрация РНК в конечном растворе составляла 35–40 мкг/мл. Из протокола был исключен этап обработки ДНКазой I, так как в качестве затравок для последующей обратной транскрипции (ОТ) использовали праймеры, специфические для сплайсированной мРНК исследуемых генов, разработанные компанией «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Реакцию ОТ проводили с помощью ген-специфичных праймеров, наборов реагентов, протоколов и оборудования «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Экспрессию мРНК измеряли в относительных единицах,

определяемых методом сравнения индикаторных циклов (Cp), как описано ранее [16, 17]. В результате анализа в каждом образце клеточного материала выявлен относительный уровень экспрессии мРНК 63 генов, относящихся к разным функциональным кластерам (табл. 3).

Таблица 3. Гены, включенные в анализ

Table 3. Genes included in the analysis

| Гены Genes | Биологическая функция Biological function |
|---|---|
| <i>Ki-67, CCND1, CCNB1, PTEN, STK-15 (AURKA), P16INK4A, P14ARF, HER2/neu (C-erbB2), TERT</i> | Пролиферация Proliferation |
| <i>BCL2, BAX, BAG1, NDRG1, BIRC5</i> | Апоптоз Apoptosis |
| <i>C-MYC, MYBL2</i> | Транскрипция Transcription |
| <i>MMP2, MMP7, MMP8, MMP9, MMP11, CTSL2, PAPP, TPA</i> | Межклеточные взаимодействия Intercellular interactions |
| <i>ESR1, PGR, CYP19A1, GRB7, CD45, CD56, CD68, CD69</i> | Дифференцировка клеток Cell differentiation |
| <i>VEGFA121, VEGFA165, VEGFA189, SCUBE2, IGF1, IGF2, TGFβ</i> | Факторы роста Growth factors |
| <i>IL1β, IL2, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12α, IL15, COX-2, TNFα, TLR2, TLR4, TLR7, IFNγ, GNLy, HLA-G1, HLA-G5, LIF, LIFR, LGALS1, GATA3, IL2Ra, GREM1</i> | Регуляция иммунного ответа Regulation of the immune response |
| <i>GSTM1</i> | Метаболизм Metabolism |

Статистический анализ базы данных выполнен с помощью программных пакетов Microsoft Excel и Statistica 13 (США). Были использованы параметрические методы (*t*-критерий Стьюдента для нормального распределения) и дискриминантный анализ с пошаговым включением/исключением переменных. Принцип дискриминантного анализа описан ранее [17]. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Диагностически значимые гены выделяли по статистически значимым различиям между группами ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования выполнено сравнение профиля экспрессии мРНК 62 генов в неизменной слизистой оболочке ПК между группами «КРР» и «Норма». Использование серии *t*-критериев при сравнении групп по каждому гену в зависимости от локализации опухолевого процесса в ТК позволило

выявить 34 гена с достоверными ($p < 0,05$) различиями уровня экспрессии мРНК (табл. 4).

У пациентов с раком ПК по сравнению с контрольной группой отмечены достоверно более высокие

Таблица 4. Значения относительного уровня экспрессии матричной РНК исследуемых генов в группах «Норма» и «Колоректальный рак» в зависимости от локализации опухоли в отделах толстой кишки, $\mu \pm \sigma$

Table 4. Values of the relative level of matrix RNA expression of the studied genes in the "Norm" group and in the "Colorectal cancer" group depending on the location of the tumor in the sections of the colon, $\mu \pm \sigma$

| Ген Gene | Норма (n = 41) Norm (n = 41) | ПК (n = 19) R (n = 19) | СОК (n = 14) SC (n = 14) | НОК (n = 6) DC (n = 6) | ВОК (n = 10) AC (n = 10) |
|-------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| BAG1 | 5,0 ± 1,0 | 5,0 ± 1,3 | 4,4 ± 0,8* | 4,8 ± 0,9 | 5,1 ± 0,7 |
| BAX | 8,4 ± 4,6 | 11,3 ± 1,3* | 6,8 ± 5,4 | 10,9 ± 0,8 | 7,6 ± 5,4 |
| CCNB1 | 6,1 ± 3,2 | 7,9 ± 1,5* | 6,5 ± 2,8 | 7,5 ± 0,8 | 6,4 ± 4,1 |
| CD45 | 6,9 ± 3,2 | 9,1 ± 1,9** | 7,61 ± 3,0 | 9,2 ± 1,5 | 5,6 ± 4,1 |
| CD56 | 1,5 ± 2,4 | 3,3 ± 3,7* | 3,2 ± 4,2 | 2,7 ± 3,5 | 2,2 ± 3,6 |
| CD69 | 5,9 ± 2,8 | 8,0 ± 2,3** | 6,4 ± 3,5 | 8,0 ± 2,5* | 4,9 ± 3,6 |
| COX-2 | 12,2 ± 5,4 | 16,1 ± 3,0** | 12,9 ± 5,8 | 15,9 ± 3,1 | 11,0 ± 6,6 |
| CTSL2 | 11,4 ± 1,6 | 9,9 ± 2,7** | 10,8 ± 1,7 | 11,7 ± 1,4 | 10,9 ± 2,0 |
| GNLY | 10,4 ± 7,8 | 16,0 ± 4,3** | 12,8 ± 7,2 | 17,7 ± 2,4* | 10,1 ± 8,8 |
| GRB7 | 17,5 ± 1,2 | 16,6 ± 1,2* | 17,3 ± 1,0 | 17,3 ± 1,1 | 17,3 ± 1,7 |
| GREM1 | 3,7 ± 5,5 | 8,4 ± 4,4** | 4,1 ± 4,5 | 8,3 ± 5,3 | 7,7 ± 5,4* |
| HLA-G1 | 5,2 ± 5,4 | 9,9 ± 5,1** | 5,91 ± 6,24 | 11,4 ± 2,9** | 5,1 ± 6,9 |
| IFNg | 4,8 ± 5,5 | 9,3 ± 4,4** | 7,9 ± 5,52 | 8,7 ± 4,7 | 5,2 ± 5,5 |
| IGF2 | 1,5 ± 3,4 | 4,2 ± 5,9* | 1,8 ± 4,6 | 3,8 ± 5,9 | 4,2 ± 5,5 |
| IL2 | 0,2 ± 1,0 | 1,67 ± 3,0** | 2,8 ± 4,1*** | 1,2 ± 2,9 | 1,9 ± 3,2** |
| IL6 | 4,9 ± 6,1 | 9,1 ± 6,1* | 4,5 ± 5,8 | 7,3 ± 8,2 | 5,2 ± 6,9 |
| KI67 | 4,7 ± 2,3 | 6,3 ± 1,6* | 6,0 ± 2,4 | 5,5 ± 0,7 | 4,8 ± 3,5 |
| LGALS1 | 9,8 ± 4,4 | 12,1 ± 1,9* | 10,2 ± 3,6 | 12,0 ± 1,7 | 8,9 ± 6,3 |
| LIF | 6,2 ± 5,3 | 8,5 ± 5,1 | 2,7 ± 5,4* | 7,6 ± 6,1 | 5,4 ± 5,7 |
| MMP8 | 4,4 ± 6,0 | 10,0 ± 5,8** | 9,2 ± 6,2* | 12,2 ± 1,5** | 6,7 ± 7,3 |
| MMP9 | 11,1 ± 5,4 | 13,7 ± 1,9* | 13,5 ± 2,4 | 13,3 ± 2,0 | 11,8 ± 4,8 |
| MYBL2 | 4,1 ± 2,6 | 5,8 ± 1,7* | 5,2 ± 2,5 | 4,2 ± 1,6 | 6,1 ± 2,5* |
| MYC | 2,9 ± 1,3 | 3,7 ± 1,2* | 4,0 ± 2,1* | 3,0 ± 0,7 | 4,4 ± 1,6** |
| P14ARF | 11,7 ± 4,7 | 11,0 ± 3,5 | 10,3 ± 3,8 | 10,4 ± 5,9 | 7,3 ± 6,4* |
| P16INK4A | 12,4 ± 1,9 | 11,5 ± 1,8 | 11,0 ± 2,3* | 12,0 ± 2,0 | 11,9 ± 2,4 |
| PGR | 0,5 ± 1,4 | 2,1 ± 3,7* | — | 3,4 ± 3,8** | 3,0 ± 4,8** |
| PTEN | 18,1 ± 0,6 | 18,1 ± 0,8 | 18,2 ± 0,9 | 18,4 ± 0,4 | 17,6 ± 0,5* |
| SCUBE2 | 1,8 ± 3,5 | 3,8 ± 3,6* | 1,8 ± 3,2 | 1,5 ± 2,4 | 1,7 ± 3,7 |
| STK15 | 2,7 ± 1,2 | 3,5 ± 0,9* | 3,1 ± 1,7 | 2,7 ± 0,9 | 2,9 ± 2,0 |
| TGFb | 8,2 ± 3,2 | 9,8 ± 1,1* | 8,9 ± 1,6 | 9,6 ± 1,7 | 9,1 ± 1,9 |
| TLR2 | 10,7 ± 5,4 | 13,6 ± 2,2* | 9,6 ± 5,7 | 13,9 ± 2,2 | 9,0 ± 6,5 |
| TLR4 | 8,1 ± 3,9 | 10,7 ± 2,2** | 8,7 ± 4,0 | 11,1 ± 2,0 | 6,1 ± 4,6 |
| TLR7 | 3,4 ± 3,0 | 4,9 ± 2,1* | 3,1 ± 3,0 | 4,0 ± 2,8 | 4,0 ± 3,9 |
| VEGFA121 | 4,2 ± 1,4 | 4,8 ± 1,4 | 5,0 ± 0,6* | 4,6 ± 1,06 | 5,1 ± 1,3 |

* $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Примечание. Здесь и в табл. 5: ПК — прямая кишка; СОК — сигмовидная ободочная кишка; НОК — нисходящая ободочная кишка и селезеночный угол; ВОК — восходящая ободочная кишка и печеночный угол.

Note. Here and in Table 5: R — rectum; SC — sigmoid colon; DC — descending colon and splenic angle; AC — ascending colon and hepatic angle.

средние значения уровня экспрессии мРНК 26 генов разных функциональных групп ($p < 0,05$) и более низкие 2 генов (*CTSL2* и *GRB7*). Взятие материала в этих случаях осуществлялось на относительно небольшом расстоянии от опухоли (до 15 см). При раке сигмовидной кишки (расстояние от опухоли до места взятия материала 20–70 см) обнаружены достоверные различия в экспрессии 7 генов (*MYC*, *BAG1*, *P16INK4A*, *IL2*, *MMP8*, *VEGFA121*, *LIF*), при раке нисходящей ободочной кишки (расстояние до места взятия материала 70–90 см) – 5 генов (*PGR*, *GNLY*, *MMP8*, *CD69*, *HLA-G1*), при раке восходящей ободочной кишки (расстояние до 150 см) – 7 генов (*MYC*, *PTEN*, *PGR*, *MYBL2*, *P14ARF*, *GREM1*, *IL2*) (см. табл. 4). Для 8 генов (*CD69*, *GNLY*, *HLA-G1*, *IL2*, *MMP8*, *MYBL2*, *MYC*, *PGR*) отмечены достоверные отличия от материала нормы при локализации опухоли в 2 и более отделах. В отношении генов *IL2*, *MMP8*, *MYC*, *PGR* выявлен достоверно более высокий уровень экспрессии при локализации опухоли в 3 различных анатомических отделах ТК. Таким образом, можно предположить, что наличие злокачественной опухоли оказывает наибольшее влияние на функциональную активность данных генов в морфологически неизмененных тканях.

Уровни экспрессии генов, кодирующих фактор транскрипции *MYC* и цитокин интерлейкин-2 (*IL-2*), достоверно отличались от нормы при локализации опухоли в ПК, сигмовидном и восходящем отделах. Увеличение уровня экспрессии цитокина *IL-2* при развитии КРП, возможно, является следствием изменения его функциональной активности, направленной на поддержание гастроинтестинального барьера и предотвращение хронического воспаления в кишечном тракте [18]. Онкоген *MYC* играет большую роль в канцерогенезе; нарушение его экспрессии через активированный сигнальный путь Wnt/ β -катенин отмечается более чем в 70 % опухолей различных локализаций [19]. Для гена *MMP8* обнаружены достоверные различия при локализации новообразования в ПК, сигмовидном и нисходящем отделах. Белок *MMP8* главным образом вырабатывается нейтрофилами при воспалительных реакциях, обнаруживается при злокачественных опухолях и, как считается, участвует в перестройке межклеточного матрикса. Белки матриксных металлопротеаз (matrix metalloproteinases, ММР) посредством сложных механизмов, включающих индукцию многих молекулярных сигнальных путей и в частности процесс эпителиально-мезенхимального перехода, играют большую роль в трансформации предраковых поражений и полипов в прогрессирующий КРП [20]. На рис. 1 показаны достоверные изменения экспрессии генов, кодирующих *MMP-8*, фактор транскрипции *MYC* и цитокин *IL-2*, по мере изменения расстояния от опухоли до места забора материала ($p < 0,05$).

Аналогичный статистический анализ уровней экспрессии при полипозе ТК в зависимости от локализации полипа выявил достоверные ($p < 0,05$) отличия

от нормы уровня экспрессии 6 генов из функциональных кластеров регуляции дифференцировки клеток (*PGR*), факторов роста (*IGF1*), иммунного ответа (*IL1b*, *IL2*, *IL8*), регуляции метаболических реакций (*GSTM1*) (табл. 5).

Глутатион-S-трансферазы (*GST*) представляют собой семейство ферментов, ответственных за метаболизм широкого спектра ксенобиотиков и канцерогенов. В литературе показано, что экспрессия *GSTM1* может быть изменена при КРП [21]. В тканях неизмененной слизистой при полипозе был обнаружен достоверно более высокий уровень *GSTM1* при локализации

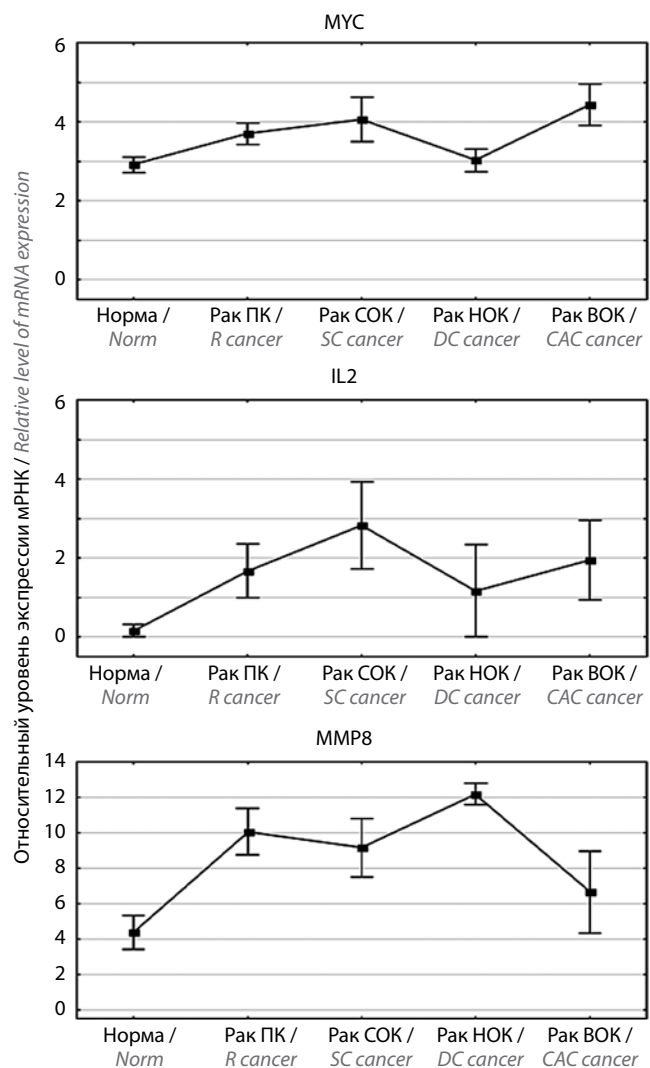


Рис. 1. Уровни экспрессии генов *MMP8*, *MYC* и *IL2* при локализации колоректального рака в разных отделах кишечника по сравнению с нормальной слизистой оболочкой прямой кишки. Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Норма – здоровая слизистая оболочка прямой кишки; ПК – прямая кишка; СОК – сигмовидная ободочная кишка; НОК – нисходящая ободочная кишка; ВОК – восходящая ободочная кишка; мРНК – матричная РНК
Fig. 1. Expression levels of *MMP8*, *MYC* and *IL2* genes when colorectal cancer is localized in different parts of the intestine in comparison with normal rectal mucosa. Data are presented as means and standard error of the mean. Normal – healthy rectal mucosa; R – rectal; SC – sigmoid colon; DC – descending colon; CAC ascending colon; mRNA – matrix RNA

Таблица 5. Экспрессия матричной РНК в группах «Норма» и «Полипоз» с различной локализацией полипа в отделах толстой кишки

Table 5. Expression of matrix RNA in the "Norm" and "Polyposis" groups with different localization of the polyp in parts of the colon

| Ген Gene | Норма (n = 41) Norm (n = 41) | Полипоз Polyposis | | | |
|--------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | ПК (n = 41) R (n = 15) | СОК (n = 41) SC (n = 6) | НОК (n = 41) DC (n = 5) | ВОК (n = 41) AC (n = 6) |
| <i>GSTM1</i> | 1,9 ± 4,0 | 5,1 ± 5,0* | 4,8 ± 5,6 | 3,4 ± 4,7 | 4,7 ± 5,1 |
| <i>IGF1</i> | 6,9 ± 5,8 | 7,3 ± 5,7 | 11,8 ± 1,7* | 10,8 ± 0,8 | 7,6 ± 5,8 |
| <i>IL1b</i> | 22,8 ± 3,7 | 19,7 ± 3,5** | 20,3 ± 2,9 | 19,7 ± 1,5 | 20,3 ± 1,2 |
| <i>IL2</i> | 0,2 ± 1,0 | 2,1 ± 3,6** | 3,2 ± 4,9*** | 1,2 ± 2,7 | — |
| <i>IL8</i> | 16,9 ± 3,8 | 14,3 ± 3,1* | 14,7 ± 2,0 | 14,6 ± 1,8 | 14,9 ± 2,5 |
| <i>PGR</i> | 0,5 ± 1,4 | 0,4 ± 1,6 | — | 1,2 ± 2,7 | 2,0 ± 3,2* |

процесса в ПК и тенденции к его повышению при других локализациях. Интерлейкин-8 (IL-8) является основным медиатором воспалительной реакции. Он секретируется опухолевыми клетками, способствует миграции, инвазии, ангиогенезу и метастазированию опухоли. Сообщается также, что сывороточный IL-8 может рассматриваться в качестве биомаркера для выявления КРР [22]. Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1R) регулирует несколько сигнальных путей, ответственных за клеточную пролиферацию, выживание и апоптоз при карциномах ТК [23].

Таким образом, на первом этапе исследования было установлено, что достоверные различия уровня экспрессии мРНК генов разных функциональных групп при раке и полипозе ТК обнаруживаются в неизменной слизистой ПК при локализации патологического процесса в вышележащих отделах ТК (см. табл. 4, 5). Это послужило обоснованием к объединению данных по отделам в группы патологии «КРР» и «Полипоз» с последующим сопоставлением уровня экспрессии мРНК генов и типа патологии в ТК.

Попарное сравнение экспрессии мРНК в группах «Норма» и «КРР» показало достоверные различия уровня экспрессии 19 генов из разных функциональных кластеров (табл. 6). Уровень экспрессии мРНК 18 генов в группе «КРР» был достоверно выше, чем в группе «Норма», за исключением гена *CTSL2*. Для генов *GREM1*, *MMP8*, *IGF2* и *IL2* при КРР показано более чем двукратное увеличение экспрессии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным литературы, повышенная экспрессия *GREM1* в криптах ТК подавляет регуляцию сигнальной системы морфогенетических белков BMP (bone morphogenetic proteins) [24]. Отсутствие сигналов BMP является важным фактором развития рака ТК

при ювенильном полипозе, непосредственно связанным с мутацией на хромосоме 15q13.3. У таких пациентов могут развиваться полипы множественной и смешанной морфологии, включая зубчатые поражения, полипы Пейтца–Егерса, ювенильные полипы, обычные аденомы и КРР. При этом у здоровых лиц экспрессия *GREM1* ограничена субэпителиальными миофибробластами кишечника в основании крипты. У пациентов с наследственным смешанным полипозом экспрессия *GREM1* распространяется и на эпителиальные клетки, преимущественно колоноциты [24]. Стоит отметить, что многофункциональный ген *GREM1* также негативно регулирует канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин, играющий ключевую роль в развитии КРР [25].

Сравнение групп «Норма» и «Полипоз» показало достоверные различия значений экспрессии мРНК 6 генов. При сравнении групп «Полипоз» и «КРР» выявлены достоверные различия средних значений экспрессии мРНК 16 генов (см. табл. 6).

Таким образом, результаты анализа показали изменения молекулярного фенотипа морфологически нормальной ткани органа, в котором локализуется опухоль. Подобные изменения могут являться возможным отражением фенотипического фона, на котором возникло новообразование, а также быть следствием влияния опухоли на нормальные ткани. При наличии доброкачественной опухоли (полипа) молекулярные изменения в морфологически неизмененных тканях также наблюдаются, но число достоверно отличающихся генов меньше, чем при развитии злокачественной патологии.

Для практического применения метода диагностики патологии ТК важен вопрос выбора генов-предикторов, поэтому следующим шагом была оценка возможности разделить образцы клеточного материала на группы: «Норма» (без патологии ТК), «Полипоз» и «КРР».

Таблица 6. Результаты попарного сравнения экспрессии матричной РНК (мРНК) в группах «Колоректальный рак» (КРР), «Полипоз» и «Норма», $\mu \pm \sigma$

Table 6. Results of pairwise comparison of matrix RNA (mRNA) expression in the "Colorectal cancer" (CRC), "Polyposis" and "Norm" groups, $\mu \pm \sigma$

| Ген Gene | Уровень экспрессии мРНК mRNA expression level | | | Уровень достоверности отличий (p) Level of significance of differences (p) | | |
|-------------|--|--|------------------------------|---|-------------------------------------|--|
| | Норма (n = 41) Norm (n = 41) | Полипоз (n = 32) Polyposis (n = 32) | КРР (n = 49) CRC (n = 49) | Норма/полипоз Norm/polyposis | Норма/КРР Norm/colorectal cancer | КРР/полипоз Colorectal cancer/polyposis |
| CCND1 | 7,7 ± 2,0 | 8,0 ± 0,9 | 8,4 ± 0,9 | 0,56 | 0,04* | 0,04* |
| CD45 | 6,9 ± 3,2 | 6,3 ± 2,6 | 8,0 ± 3,0 | 0,42 | 0,10 | 0,01* |
| CD56 | 1,5 ± 2,4 | 3,4 ± 3,8 | 3,0 ± 3,7 | 0,02* | 0,04* | 0,68 |
| CD69 | 5,9 ± 2,8 | 5,6 ± 2,8 | 7,0 ± 3,2 | 0,59 | 0,10 | 0,04* |
| COX-2 | 12,2 ± 5,4 | 10,0 ± 4,2 | 14,1 ± 5,1 | 0,06 | 0,09 | <0,001*** |
| CTSL2 | 11,4 ± 1,6 | 11,3 ± 2,0 | 10,6 ± 2,2 | 0,74 | 0,04* | 0,16 |
| GNLY | 10,4 ± 7,8 | 14,8 ± 6,1 | 14,1 ± 6,5 | 0,01* | 0,017* | 0,61 |
| GRB7 | 17,5 ± 1,2 | 17,7 ± 0,7 | 17,1 ± 1,2 | 0,57 | 0,07 | 0,01* |
| GREM1 | 3,7 ± 5,5 | 2,3 ± 3,8 | 7,0 ± 5,0 | 0,24 | <0,01** | <0,001*** |
| GSTM1 | 1,9 ± 4,0 | 4,7 ± 4,9 | 3,1 ± 4,6 | 0,01* | 0,202 | 0,15 |
| HER2 | 9,0 ± 1,2 | 9,2 ± 1,0 | 8,7 ± 1,0 | 0,43 | 0,22 | 0,03* |
| HLA-G1 | 5,2 ± 5,4 | 6,9 ± 5,4 | 8,0 ± 6,0 | 0,18 | 0,03* | 0,44 |
| IFNg | 4,8 ± 5,5 | 5,9 ± 5,7 | 8,0 ± 5,1 | 0,43 | 0,01** | 0,08 |
| IGF2 | 1,5 ± 3,4 | 0,9 ± 2,8 | 3,5 ± 5,4 | 0,44 | 0,042* | 0,01 |
| IL1b | 22,8 ± 3,7 | 19,9 ± 2,7 | 23,4 ± 3,6 | <0,001*** | 0,45 | <0,001*** |
| IL2 | 0,2 ± 1,0 | 1,8 ± 3,4 | 2,0 ± 3,3 | <0,01** | 0,00** | 0,76 |
| IL6 | 4,9 ± 6,1 | 2,9 ± 4,9 | 6,8 ± 6,6 | 0,13 | 0,17 | 0,01** |
| IL8 | 16,9 ± 3,8 | 14,5 ± 2,5 | 18,2 ± 3,2 | <0,01** | 0,08 | <0,001*** |
| KI67 | 4,7 ± 2,3 | 4,9 ± 2,3 | 5,8 ± 2,3 | 0,77 | 0,03* | 0,08 |
| MMP8 | 4,4 ± 6,0 | 2,0 ± 4,5 | 9,4 ± 6,0 | 0,07 | 0,00*** | <0,001*** |
| MMP9 | 11,1 ± 5,4 | 9,9 ± 3,8 | 13,2 ± 2,9 | 0,29 | 0,019* | 0,001*** |
| MYBL2 | 4,1 ± 2,6 | 4,4 ± 1,8 | 5,5 ± 2,1 | 0,57 | 0,01** | 0,02* |
| MYC | 2,9 ± 1,3 | 2,9 ± 1,2 | 3,9 ± 1,6 | 1,00 | 0,00** | <0,01** |
| PGR | 0,4 ± 1,4 | 0,8 ± 2,1 | 1,8 ± 3,6 | 0,45 | 0,02* | 0,13 |
| P16INK4A | 12,4 ± 1,9 | 11,7 ± 1,7 | 11,5 ± 2,1 | 0,12 | 0,04* | 0,60 |
| TGFb | 8,2 ± 3,2 | 8,3 ± 2,3 | 9,4 ± 1,5 | 0,87 | 0,02* | 0,01* |
| TNFa | 11,0 ± 3,8 | 10,4 ± 2,5 | 12,2 ± 2,5 | 0,45 | 0,08 | <0,01** |
| VEGFA121 | 4,2 ± 1,4 | 4,7 ± 0,9 | 4,9 ± 1,1 | 0,09 | <0,01** | 0,37 |
| VEGFA165 | 7,3 ± 2,2 | 8,0 ± 0,9 | 8,2 ± 1,4 | 0,11 | 0,03* | 0,53 |

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Примечание. Значения p получены с помощью t-критерия Стьюдента при попарном сравнении групп.

Note. p-value obtained using Student's t test for pairwise comparison of groups.

Анализ с пошаговым включением переменных (генов) в модель дискриминантных функций позволил определить 31 ген, вносящий наибольший вклад в разделение групп. Модель классификации показала возможность дифференцировки образцов, взятых из неизменной слизистой ПК пациентов с КРР, от образцов, полученных от лиц без патологии ТК, с общей точностью классификации 99 % (табл. 7; рис. 2).

Образцы клеточного материала, полученные у лиц контрольной группы, были правильно классифицированы в 100 % случаев. При КРР образцы правильно распределены в свою группу в 98 % случаев. При включении в дискриминантный анализ групп «КРР» и «Полипоз» образцы группы «Полипоз» были правильно распределены в свою группу в 97 % случаев, образцы группы «КРР» – в 96 % (табл. 8; рис. 2).

В модель классификации определяющий вклад в дискриминацию групп «Норма» и «КРР» вносит экспрессия генов *IL8*, *IL1b*, *P14ARF*, *GNLY*, а в разделение групп «КРР» и «Полипоз» – генов *IL8*, *TLR2*, *VEGFA165*, *IFN γ* и *GREM1*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящего исследования впервые проведен анализ экспрессионного фенотипа материала соскобов слизистой оболочки ПК в зависимости от типа (рак или полипоз) и локализации патологического процесса в ТК. Установлено, что уровень экспрессии мРНК генов в неизменной слизистой оболочке ПК, независимо от локализации доброкачественной или злокачественной опухоли в ТК, отличается от экспрессии соответствующих генов у лиц без заболевания ТК. Метод дискриминантного анализа позволил классифицировать образцы на группы «Норма» (без патологии ТК), «Полипоз» и «КРР» с точностью выше 96 %, что свидетельствует о потенциально высокой диагностической значимости разработанного алгоритма. Малоинвазивный характер забора материала для исследования и возможность выполнения процедуры его получения в амбулаторных условиях создают предпосылки для использования данного подхода в сочетании с уже приме-

Таблица 7. Классификационная матрица дискриминантного анализа, включающая 23 гена: соответствие классификации образцов по молекулярному фенотипу их принадлежности к группам «Норма» и «Колоректальный рак» (КРР)

Table 7. Classification matrix of discriminant analysis, including 23 genes: correspondence of the classification of samples by molecular phenotype with their belonging to the "Normal" and "Colorectal cancer" (CRC) groups

| Группа Group | Число правильно классифицированных случаев, % Number of correct classified cases, % | Распределение образцов в группы согласно дискриминантной модели, n Distribution of samples into groups according to the discriminant model, n | |
|-----------------|--|--|------------|
| | | Норма Norm | КРР CRC |
| Норма Norm | 100 | 41 | 0 |
| КРР CRC | 98 | 1 | 48 |
| Всего Total | 99 | 42 | 48 |

Примечание. Здесь и в табл. 8 представлено число корректно классифицированных образцов исследуемых групп и тех образцов, которые ошибочно отнесены по результатам классификации к другим группам.

Note. Here and in the table. Figure 8 shows the number of correctly classified samples of the studied groups and those samples that were erroneously assigned to other groups based on the classification results.

что свидетельствует о потенциально высокой диагностической значимости разработанного алгоритма. Малоинвазивный характер забора материала для исследования и возможность выполнения процедуры его получения в амбулаторных условиях создают предпосылки для использования данного подхода в сочетании с уже приме-

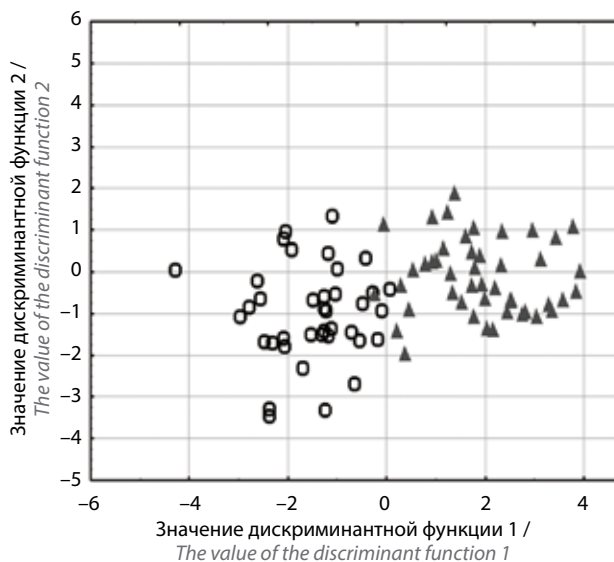
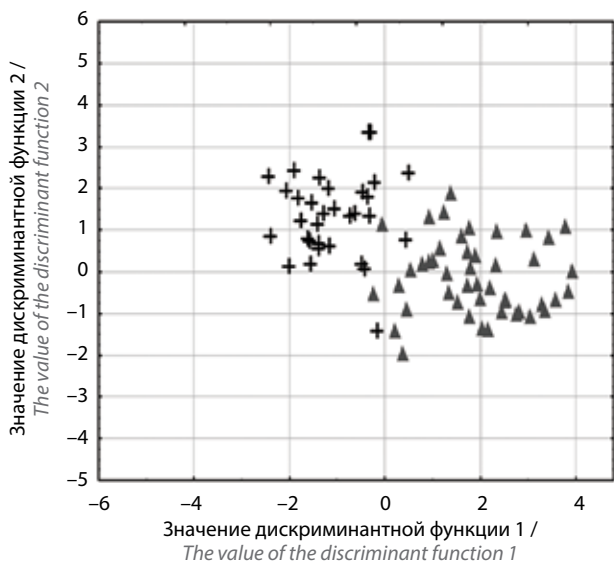


Рис. 2. График рассеяния: распределение образцов в пространстве дискриминантных функций. ○ – группа «Норма», + – группа «Полипоз», ▲ – группа «Колоректальный рак»

Fig. 2. Scatter plot: distribution of samples in discriminant function space. ○ – "Normal" group, + – "Polyposis" group, ▲ – "Colorectal cancer" group

Таблица 8. Классификационная матрица дискриминантного анализа, включающая 21 ген: соответствие классификации образцов по молекулярному фенотипу их принадлежности к группам «Полипоз» и «Колоректальный рак» (КРР) согласно дискриминантной модели

Table 8. Classification matrix of discriminant analysis, including 21 genes: correspondence of the classification of samples by molecular phenotype with their belonging to the group "Polyposis" and "Colorectal cancer" (CRC) according to the discriminant model

| Группа Group | Число правильно классифицированных случаев, % Number of correct classified cases, % | Распределение образцов в группы согласно дискриминантной модели, n Distribution of samples into groups according to the discriminant model, n | |
|----------------------|--|--|------------|
| | | Полипоз Polyposis | КРР CRC |
| Полипоз Polyposis | 96,9 | 31 | 1 |
| КРР CRC | 95,8 | 2 | 45 |
| Всего Total | 96,2 | 33 | 46 |

няющимися лабораторными тестами не только в целях уточняющей или дифференциальной диагностики, но и в формате скрининга. Для подтверждения получен-

ных результатов в дальнейшем планируется проведение исследования на валидационной когорте пациентов, а затем и в рамках клинических испытаний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shaukat A., Kahi C.J., Burke C.A. et al. ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021. *Am J Gastroenterol* 2021;16(3):458–79. DOI: 10.14309/ajg.0000000000001122
- Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. The state of oncological care to the population of Russia in 2021. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution "NMIC of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, 2022. 239 p. (In Russ.).
- Swiderska M., Choromańska B., Dąbrowska E. et al. The diagnostics of colorectal cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014;18(1):1–6. DOI: 10.5114/wo.2013.39995
- Raginel T., Puvinel J., Ferrand O. et al. A population-based comparison of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *Gastroenterology* 2013;144(5):918–25. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.042
- Wang X., Kuang Y.Y., Hu X.T. Advances in epigenetic biomarker research in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(15):4276–87. DOI: 10.3748/wjg.v20.i15.4276
- Galandiuk S., Rodriguez-Justo M., Jeffery R. et al. Field cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 2012;142(4):855–64. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.12.004
- Dampier C.H., Devall M., Jennelle L.T. et al. Oncogenic features in histologically normal mucosa: novel insights into field effect from a mega-analysis of colorectal transcriptomes. *Clin Transl Gastroenterol* 2020;11(7):e00210. DOI: 10.14309/ctg.0000000000000210
- Hegde M., Ferber M., Mao R. et al. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med* 2014;16(1):101–16. DOI: 10.1038/gim.2013.166
- Bozic I., Antal T., Ohtsuki H. et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(43):18545–50. DOI: 10.1073/pnas.1010978107
- 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
- Kulinich T.M., Zaharenko 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.). DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-39-46
- Aran D., Camarda R., Odegaard J. et al. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nat Commun* 2017;8(1):1077. DOI: 10.1038/s41467-017-01027-z
- Hawthorn L., Lan L., Mojica W. Evidence for field effect cancerization in colorectal cancer. *Genomics* 2014;103(2–3):211–21. DOI: 10.1016/j.ygeno.2013.11.003
- Sanz-Pamplona R., Berenguer A., Cordero D. et al. 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
- Russi S., Calice G., Ruggieri V. et al. Gastric normal adjacent mucosa versus healthy and cancer tissues: distinctive transcriptomic profiles and biological features. *Cancers (Basel)* 2019;11(9):1248. DOI: 10.3390/cancers11091248
- Боженко В.К., Захаренко М.В., Гончаров С.В. и др. Фенотипические изменения в морфологически нормальной ткани опухолевого окружения. Диагностические перспективы. Клиническая лабораторная диагностика 2021;66(S4):17–8. Bozhenko V.K., Zakharenko M.V., Goncharov S.V. et al. Phenotypic changes in morphologically normal tissue of the tumor environment. Diagnostic perspectives. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2021;66(S4):17–8. (In Russ.).
- Боженко В.К., Станоевич У.С., Троценко И.Д. и др. Сравнение экспрессии мРНК матриксных 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 mRNA expression of matrix metalloproteinases in morphologically normal, neoplastic and metastatic colon tissues and in biopsies of healthy donors. *Biomedicinskaya himiya = Biomedical Chemistry* 2018;64(1):46–52. (In Russ.).
17. Захаренко М.В., Боженко В.К., Киселева Я.Ю. и др. Исследование профилей экспрессии мРНК генов, участвующих в регуляции основных клеточных функций в неизменённом эпителии толстой кишки у здоровых доноров. *Биомедицинская химия* 2021;67(4):366–73.
Zakharenko M.V., Bozhenko V.K., Kiseleva Ya.Yu. et al. Investigation of mRNA expression profiles of genes involved in the regulation of basic cellular functions in unchanged colon epithelium in healthy donors. *Biomedicinskaya himiya = Biomedical Chemistry* 2021;67(4):366–73. (In Russ.).
 18. Zhou L., Chu C., Teng F. et al. Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2. *Nature* 2019;568(7752):405–9. DOI: 10.1038/s41586-019-1082-x
 19. Ren L., Zhou T., Wang Y. et al. RNF8 induces β -catenin-mediated c-Myc expression and promotes colon cancer proliferation. *Int J Biol Sci* 2020;16(12):2051–62. DOI: 10.7150/ijbs.44119
 20. Pezeshkian Z., Nobili S., Peyravian N. et al. Insights into the role of matrix metalloproteinases in precancerous conditions and in colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(24):6226. DOI: 10.3390/cancers13246226
 21. Zhong S., Wyllie A.H., Barnes D. et al. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993;14(9):1821–4. DOI: 10.1093/carcin/14.9.1821
 22. Jin W.J., Xu J.M., Xu W.L. et al. Diagnostic value of interleukin-8 in colorectal cancer: a case-control study and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2014;20(43):16334–42. DOI: 10.3748/wjg.v20.i43.16334
 23. Wang Q., Zhang Y., Zhu J. et al. IGF-1R inhibition induces MEK phosphorylation to promote survival in colon carcinomas. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5(1):53. DOI: 10.1038/s41392-020-0204-0
 24. Jaeger E., Leedham S., Lewis A. et al. Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet* 2012;44(6):699–703. DOI: 10.1038/ng.2263
 25. Zhang Y., Wang, X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Hematol Oncol* 2020;13(1):165. DOI: 10.1186/s13045-020-00990-3

Вклад авторов

В.К. Боженко, В.А. Солодкий: разработка концепции и дизайна исследования, анализ научной работы, редактирование, написание текста статьи; С.В. Гончаров: разработка концепции и дизайна исследования, сбор биологического материала, формирование базы данных, статистическая обработка, написание текста статьи;

М.В. Захаренко: выделение мРНК из биологического материала, проведение ОТ-ПЦР, формирование базы данных, анализ научной работы, написание текста статьи;

Я.Ю. Киселева, Т.А. Кармакова, Т.М. Кулинич, Н.В. Мельникова: анализ научной работы, редактирование, подготовка рукописи;

У.С. Станоевич: сбор биологического материала, формирование базы данных, статистическая обработка материала;

А.Л. Сенчукова: выделение мРНК из биологического материала, проведение ОТ-ПЦР, формирование базы данных;

И.Б. Грунин: сбор биологического материала;

О.П. Близняков: выполнение морфологического исследования, редактирование.

Authors' contributions

V.C. Bozhenko, V.A. Solodky: development of the concept and design of research, analysis of scientific work, editing, article writing;

S.V. Goncharov: development of the concept and design of research, collection of biological material, database formation, statistical processing, article writing;

M.V. Zakharenko: isolation of RNA from biological material, conducting RT-PCR, database formation, analysis of scientific work, article writing;

Ya.Yu. Kiseleva, T.A. Karmakova, T.M. Kulnich, N.V. Melnikova: analysis of scientific work, editing, preparation of the manuscript;

U.S. Stanoevich: collection of biological material, database formation, statistical processing of material;

A.L. Senchukova: mRNA isolation from biological material, RT-PCR, database formation;

I.B. Grunin: collection of biological material;

O.P. Bliznyukov: performing morphological research, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

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

Я.Ю. Киселева / Ya.Yu. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>

Т.А. Кармакова / T.A. Karmakova: <https://orcid.org/0000-0002-8017-5657>

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

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>

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

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

В.А. Солодкий / V.A. Solodky: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России (протокол № 4 от 26.04.2018).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (protocol No. 4 of 04.26.18).

The patients gave written informed consent to the publication of their data.

Статья поступила: 10.10.2023. **Принята к публикации:** 22.10.2023.

Article submitted: 10.10.2023. **Accepted for publication:** 22.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-108-115>

Феномен подавления эстрогенового сигналинга в клетках рака молочной железы под действием ультрафиолетового облучения: роль белков Snail

Д. В. Сорокин^{1,2}, О. Е. Андреева¹, А. М. Щербаков^{1,2}, Д. И. Сальникова¹, М. В. Гудкова¹, М. А. Красильников^{1,2}

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

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

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Введение. Исследование влияния облучения или любых других ДНК-повреждающих агентов на чувствительность опухолей к консервативной терапии, лекарственной или гормональной, относится к числу наиболее актуальных задач, во многом определяющих целесообразность комбинированной терапии онкологических больных.

Цель исследования – изучение влияния облучения на активность ключевых сигнальных белков и уровень гормональной зависимости клеток рака молочной железы.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7. В качестве экспериментальной модели для изучения реакции опухолевых клеток на повреждение ДНК использовалось ультрафиолетовое (УФ) облучение в диапазоне 254 нм с интенсивностью 25–50 Дж/м². Скорость роста клеток определяли с помощью МТТ-теста; выживаемость клеток после облучения анализировали с использованием колониеобразующего теста. Определение транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили методом репортерного анализа, экспрессии клеточных белков – методом иммуноблоттинга.

Результаты. Однократное УФ-облучение клеток MCF-7 приводит к резкому повышению уровня апоптотических маркеров: p53, cPARP, подавлению экспрессии белков ростового сигналинга: CDK4/6 и рецептора эстрогенов α (ERα). На этом фоне наблюдается усиление фосфорилирования протеинкиназы Akt и выраженное повышение экспрессии Snail1 – одного из ключевых белков эпителиально-мезенхимального перехода. В клетках УФ-резистентной сублинии MCF-7/UVR, полученной в условиях повторяющихся циклов облучения, уровень белков апоптотического и ростового сигналинга (p53, cPARP, CDK4/6) возвращается к контрольному значению, за исключением фосфорилированной формы Akt и Snail1, содержание которых остается высоким. Трансфекция в клетки MCF-7 плазмиды, экспрессирующей Snail1, сопровождается активацией апоптотического сигналинга, снижением активности ERα и развитием частичной гормональной резистентности; при этом чувствительность клеток к облучению практически не меняется. Трансфекция микроРНК-181a-2 – одной из микроРНК, ассоциированной с резистентностью клеток, – одновременно активирует Akt и Snail1 и приводит к развитию перекрестной резистентности клеток к облучению и гормональным препаратам.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать активацию Snail1 под действием облучения в качестве одного из факторов, участвующих в дерегуляции эстрогенового сигналинга и формировании устойчивости клеток к гормональным препаратам, в то время как одновременная активация Akt и Snail1 сопровождается развитием перекрестной резистентности к облучению и гормональным соединениям.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональная резистентность, облучение, рецептор эстрогенов, Snail1, протеинкиназа Akt

Для цитирования: Сорокин Д. В., Андреева О. Е., Щербаков А. М. и др. Феномен подавления эстрогенового сигналинга в клетках рака молочной железы под действием ультрафиолетового облучения: роль белков Snail. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):108–115. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-108-115>

Phenomenon of suppression of estrogen signaling in breast cancer cells under ultraviolet irradiation: role of Snail proteins

D. V. Sorokin^{1,2}, O. E. Andreeva¹, A. M. Scherbakov^{1,2}, D. I. Salnikova¹, M. V. Gudkova¹, M. A. Krasil'nikov^{1,2}

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

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

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

Introduction. The study of the effect of irradiation or any other DNA-damaging agents on the sensitivity of tumors to conservative therapy, drug or hormonal, is among the most important tasks that determine the efficiency of combined therapy of cancer patients.

Aim. To investigate the effect of irradiation on the activity of key signaling proteins and the level of hormone dependence of breast cancer cells.

Materials and methods. The experiments were performed on in vitro cultured estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells. Ultraviolet (UV) irradiation in the range of 254 nm with the intensity of 25–50 J/m² was used as an experimental model to study the response of tumor cells to DNA damage. Cell growth rate was determined using the MTT test, cell survival after irradiation was analyzed using the colony-forming test. Estrogen receptor transcriptional activity was determined by reporter assay; cellular protein expression was determined by immunoblotting.

Results. Single UV irradiation of MCF-7 cells leads to a marked increase in the level of apoptotic markers: p53, cPARP, suppression of expression of growth signaling proteins: CDK4/6 and estrogen receptor α (ER α). The above changes are accompanied with an increase in phosphorylation of Akt protein kinase and a marked increase in the expression of Snail1, one of the key proteins of epithelial-mesenchymal transition. In UV-resistant MCF-7/UVR cell subline obtained under repeated irradiation cycles, the levels of apoptotic and growth signaling proteins (p53, cPARP, CDK4/6) return to control levels, except for the phosphorylated form of Akt and Snail1, whose content remains high. Transfection of Snail1-expressing plasmid into MCF-7 cells is accompanied by activation of apoptotic signaling, suppression of ER α activity, and development of partial hormone resistance; however, the sensitivity of cells to irradiation is practically unchanged. Transfection of microRNA-181a-2, one of the microRNAs associated with cell resistance, simultaneously activates Akt and Snail1 and leads to the development of cross-resistance of cells to irradiation and hormonal drugs.

Conclusion. The obtained data allow us to consider irradiation-induced Snail1 activation as one of the factors involved in deregulation of estrogen signaling and formation of cell resistance to hormonal drugs, while simultaneous activation of Akt and Snail1 is accompanied by the development of cross-resistance to irradiation and hormonal drugs.

Keywords: breast cancer, hormonal resistance, irradiation, estrogen receptor, Snail1, protein kinase Akt

For citation: Sorokin D.V., Andreeva O.E., Scherbakov A.M. et al. Phenomenon of suppression of estrogen signaling in breast cancer cells under ultraviolet irradiation: role of Snail proteins. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):108–15. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-108-115>

ВВЕДЕНИЕ

Основным подходом в лечении рака молочной железы (РМЖ) является сочетание хирургического вмешательства – оперативного удаления опухоли – с консервативной адъювантной или неoadъювантной терапией: облучением, лекарственной и гормональной терапией. Как известно, 70–80 % опухолей молочной железы являются эстрогензависимыми, и в этих случаях гормональная терапия оказывается одним из наиболее эффективных способов консервативного лечения. Вопрос о результативности сочетания различных видов консервативной терапии, в первую очередь гормональной терапии и облучения, изучался и продолжает анализироваться во многих работах, однако полученные данные зачастую оказываются противоречивыми. Основные вопросы – «Как влияет облучение опухолевых клеток на их уровень гормональной зависимости?», «Каков механизм возможных изменений гормональной зависимости опухолей молочной железы под действием облучения?», «Насколько долговременными оказываются такие изменения?» – практически не исследованы на экспериментальном уровне. Большинство работ в этом направлении основаны на анализе клинических данных эффективности комбинации облучения и гормональной терапии в различных группах больных и, как уже отмечалось, носят во многом противоречивый характер [1–5]. Известны лишь единичные экспериментальные работы, свидетельствующие о воз-

можности изменений гормонального сигналинга в облученных клетках [6, 7].

В целом на сегодняшний день ни в клинических, ни в экспериментальных наблюдениях не представлены доказательства влияния облучения (или отсутствия такового влияния) на уровень гормональной чувствительности злокачественных опухолей. В какой мере такие новообразования сохраняют гормональную зависимость и, соответственно, чувствительность к гормональной терапии, и, если происходят нарушения функционирования гормонального аппарата, то на каком уровне, каковы причины развития индуцированной облучением гормональной резистентности?

Ранее, с использованием культивируемых *in vitro* клеток меланомы в качестве экспериментальной модели, мы показали, что ультрафиолетовое (УФ) облучение приводит к развитию частичной устойчивости меланомы, ассоциированной с активацией одного из белков эпителиально-мезенхимального перехода – Snail1, к таргетным препаратам [8]. В настоящей работе исследовалось влияние облучения на активность ключевых сигнальных белков и уровень гормональной зависимости клеток эстрогензависимого РМЖ. Мы показали, что хроническое УФ-облучение клеток РМЖ MCF-7 приводит к формированию пула УФ-резистентных клеток, отличающихся низкой активностью рецептора эстрогенов α (ER α) и частичной гормональной резистентностью, сопровождающейся

выраженной активацией Snail. Продемонстрировано непосредственное участие Snail1 в формировании гормональной резистентности облученных клеток и показано участие одной из экзосомальных микроРНК — микроРНК-181a-2 — в поддержании высокого уровня Snail1 и развитии резистентного фенотипа клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого РМЖ MCF-7. В работе использовались следующие методы.

Культивирование клеток. Клетки MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной сыворотки телят (FBS NuClone, США) и гентамицин (50 ед./мл) (ООО «ПанЭко», Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. Культивирование клеток выполняли в инкубаторе NU-5840E (NuAire, США). При анализе скорости роста количество клеток определяли с использованием МТТ-теста.

Репортерный анализ. Для определения транскрипционной активности ER проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной George Reid [9]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применялась котрансфекция клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Активность люциферазы измерялась по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Tecan Infinite M200 Pro (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Трансфекция. Плазида, экспрессирующая Snail1, любезно предоставлена Antonio Garcia de Herreros [10]. Трансфекция клеток MCF-7 проводилась с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) по методике производителя.

В работе использовались конструкции микроРНК-scrambled- и микроРНК-181-a2 («Синтол», Россия). РНК растворяли в буфере (10 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA) в концентрации 100 мкМ и проводили отжиг по стандартной методике. Трансфекцию РНК в конечной концентрации 50 нМ выполняли с использованием реагента Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Иммуноблоттинг. Для получения тотального клеточного экстракта к образцам клеток добавляли по 130 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Tris-HCl pH 7,4; 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ тетраацетата этилендиамина, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина, 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия (Merck, США). Образцы клеточных экстрактов центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 4 °С, центрифуга Eppendorf 5417R) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг,

как описано ранее [11]. В цитозольных экстрактах исследовали содержание phospho-Akt, Akt, Snail, Slug, phospho-p53, p53, p21, CDK4, CDK6, ERα и расщепленной формы PARP (Cell Signaling Technology, США). Для контроля эффективности иммуноблоттинга использовали антитела к α-тубулину (Cell Signaling Technology, США).

Ультрафиолетовое облучение и отбор устойчивых к нему клеток. Облучение проводили с помощью УФ-лампы Vilber Lourmat (Франция) мощностью 6 Вт модели VL-6. LC (свет 254 нм). Клетки MCF-7 подвергали УФ-облучению (254 нм) интенсивностью 25 или 50 Дж/м². Для отбора УФ-резистентных клеток клетки MCF-7 подвергали воздействию УФ 1 раз в неделю в течение 12 нед, как описано ранее [12].

Колониеобразующий тест. Клетки MCF-7 рассеивали на культуральные чашки диаметром 60 мм (Corning Incorporated, Corning, США) в стандартной среде DMEM, содержащей 10 % FBS (фетальной бычьей сыворотки). На следующий день культуральную среду удаляли, клетки облучали УФС (длина волны 254 нм) и рассеивали на 6-луночный культуральный планшет (Corning, США) в стандартной культуральной среде с образованием 50–2000 колоний на лунку. Колонии фиксировали и окрашивали 20 % метанолом и 0,2 % кристаллическим фиолетовым после 10-дневного периода инкубации в инкубаторе с 5 % CO₂, 37 °С. Любую колонию, состоящую из более чем 50 клеток, оценивали как выживший клон.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого РМЖ MCF-7. Клетки облучали под лампой 6W Vilber Lourmat (Франция) модели VL-6. LC (интенсивность 25–50 Дж/м²) и через 24 ч после облучения анализировали уровень основных (анти)апоптотических белков методом иммуноблоттинга. Ультрафиолетовое облучение привело к резкому повышению уровня апоптотических маркеров p53, cPARP и подавлению экспрессии белков ростового сигналинга (CDK4/6 и ERα). На этом фоне наблюдалось усиление фосфорилирования протеинкиназы Akt и выраженное повышение экспрессии Snail1 — одного из ключевых белков эпителиально-мезенхимального перехода, при этом экспрессия другого ассоциированного с эпителиально-мезенхимальным переходом белка — Slug — практически не менялась (рис. 1, а).

Ранее мы показали, что хроническое УФ-облучение клеток MCF-7 приводит к формированию пула УФ-резистентных клеток, отличающихся относительной устойчивостью к гормональным препаратам и конститутивно низкой активностью ERα [12].

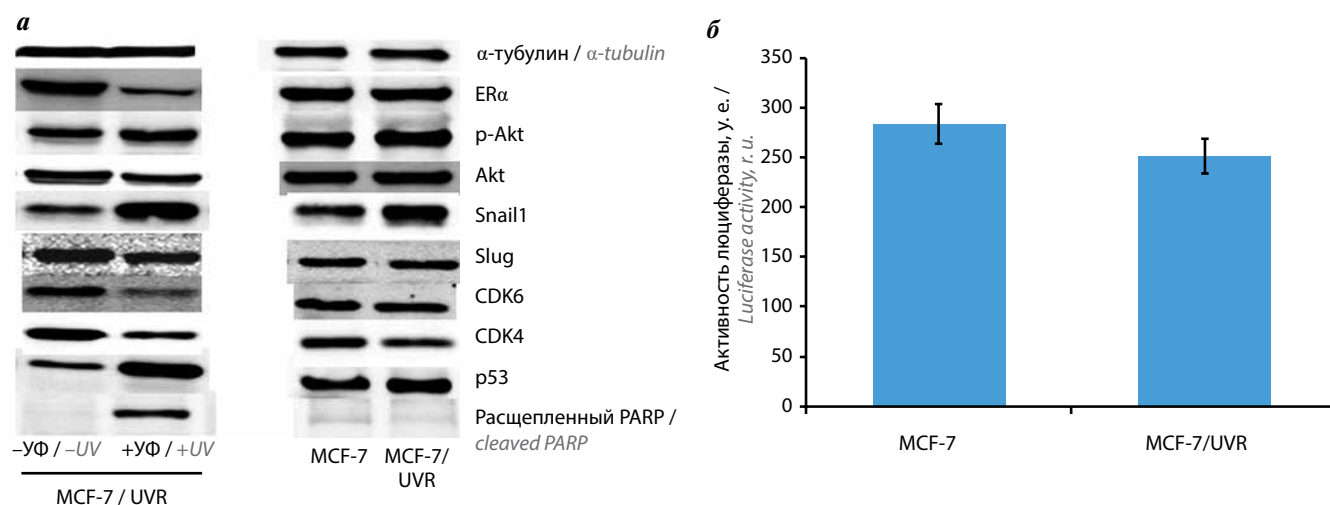


Рис. 1. Влияние ультрафиолетового (УФ) облучения на клетки MCF-7. Иммуноблоттинг образцов клеток MCF-7 через 24 ч после УФ-облучения (а) и образцов УФ-резистентной сублинии MCF-7/UVR (б). Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. Транскрипционную активность рецептора эстрогена α (ERα) анализировали методом репортерного анализа через 24 ч после трансфекции в клетки плазмиды, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом (в). Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Fig. 1. Effect of ultraviolet (UV) irradiation on MCF-7 cells. Immunoblotting of MCF-7 cell samples 24 h after UV irradiation (a) and samples of UV-resistant MCF-7/UVR subline (b) was performed. Results from one of three independent experiments are presented. Estrogen receptor α (ERα) transcriptional activity was analyzed by reporter assay 24 h after cell transfection with a plasmid containing a luciferase reporter gene under the control of an estrogen-responsive element (v). Mean values ± standard deviation of three independent experiments are presented

Проведенный в настоящем исследовании анализ содержания белков (анти)апоптотического и ростового сигналинга (p53, cPARP, CDK4/6, Akt, Snail1) показал, что уровень большинства белков в резистентных клетках возвращается к исходному и практически не отличается от уровня контрольных клеток — за исключением фосфорилированной формы Akt и Snail1, содержание которых остается высоким в резистентных клетках (рис. 1, б). Анализ транскрипционной активности ERα подтвердил незначительное снижение активности ERα в резистентных клетках (рис. 1, в).

Если активация PI3K/Akt-сигналинга при блоке ERα довольно хорошо описана и носит преимущественно компенсаторный характер [13, 14], то вопрос об участии Snail1 в подавлении эстрогенового сигналинга и развитии УФ-резистентности остается открытым. Для ответа на него клетки MCF-7 были трансфицированы плазмидой, кодирующей wSnail1, с последующим анализом экспрессии основных сигнальных белков и активности эстрогенового аппарата. Трансфекция wSnail1 приводила к развитию частичной устойчивости клеток к тамоксифену (рис. 2, а), которая сопровождалась активацией апоптотического сигналинга (рис. 2, б) и снижением активности ERα (рис. 2, в). Примечательно, что трансфекция wSnail1 практически не снижала чувствительность клеток MCF-7 к УФ-облучению (рис. 2, г), что, скорее всего, связано со Snail1-индуцированной стимуляцией апоптотического сигналинга и свидетельствует об избирательности действия Snail1 на эстрогеновый аппарат клетки.

В проведенных ранее исследованиях мы продемонстрировали возможность межклеточного распространения гормональной резистентности с участием

экзосом и выявили ключевые экзосомальные микроРНК, участвующие в формировании резистентного фенотипа. В частности, было обнаружено, что трансфекция микроРНК-181a-2 в клетки MCF-7 приводит к развитию и поддержанию частичной гормональной резистентности клеток [15]. В настоящей работе исследовалась зависимость между Snail1 и микроРНК-181a-2, а также роль последней в регуляции ответа клеток на УФ-облучение. Было обнаружено, что трансфекция микроРНК-181a-2 сопровождается стимуляцией фосфорилирования Akt и накоплением Snail1 (рис. 3, а) на фоне повышения устойчивости клеток к УФ-облучению (рис. 3, б). Собственно трансфекция Snail1 не влияет на чувствительность клеток к облучению, но стимулирует развитие гормональной резистентности (см. рис. 2), поэтому можно предположить, что в данном случае мы сталкиваемся с избирательным действием Snail1 на эстрогеновый сигналинг, в то время как одновременная активизация антиапоптотического Akt-сигналинга приводит к развитию резистентности клеток к облучению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния облучения на чувствительность опухолей к консервативной терапии (лекарственной или гормональной) относится к числу наиболее актуальных задач, во многом определяющих тактику лечения и целесообразность комбинированной терапии онкологических больных. Интерес представляют исследования, продемонстрировавшие эффект усиления множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках после облучения, связанный с накоплением в клетках ABC-транспорте-

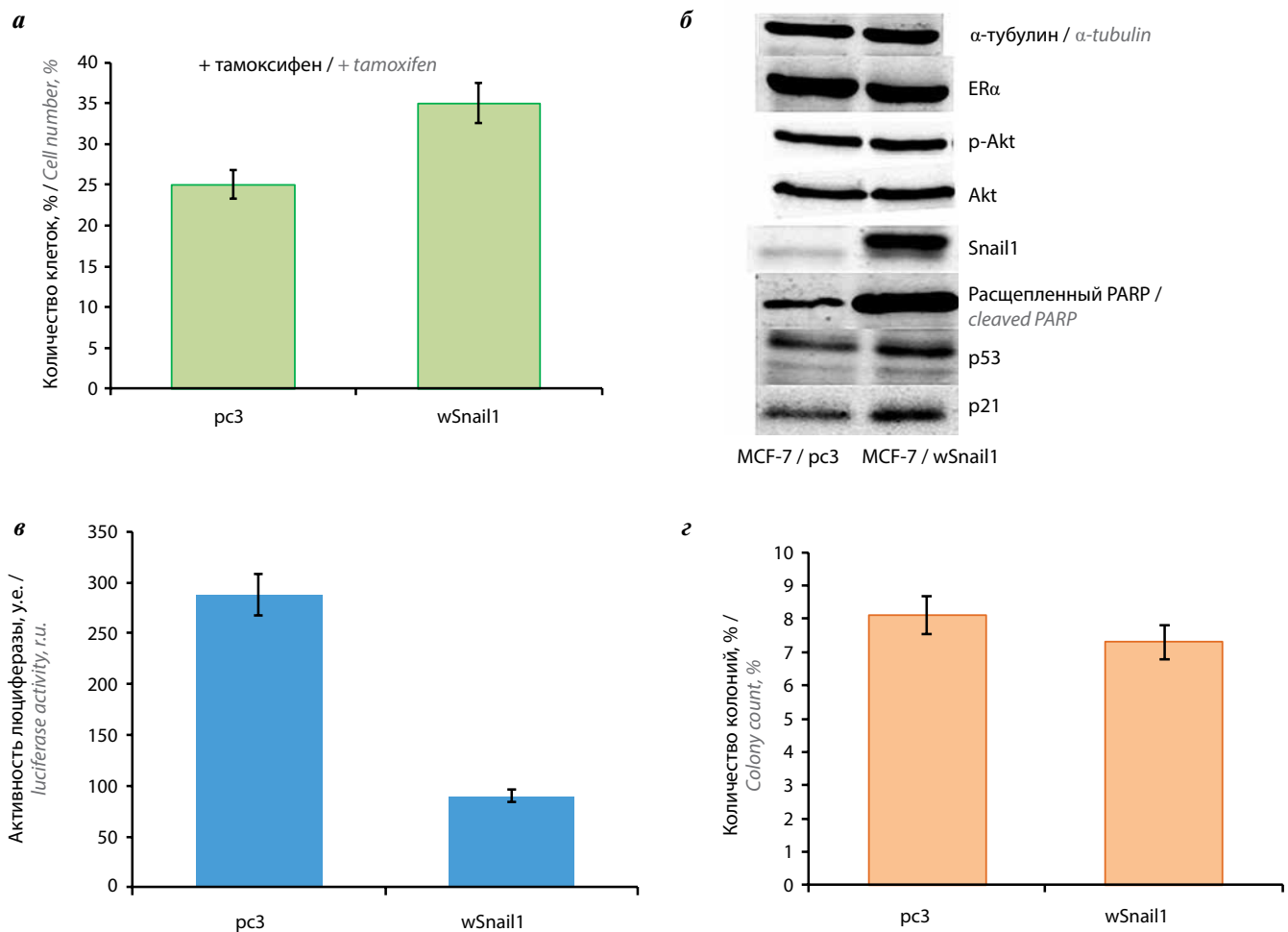


Рис. 2. Трансфекция *wSnail1* и чувствительность клеток МСF-7 к тамоксифену и ультрафиолетовому (УФ) облучению: а – через 24 ч после трансфекции клетки культивировали в присутствии 5 мкМ тамоксифена в течение 3 сут и определяли количество выживших клеток с помощью МТТ-теста; б – иммуноблоттинг образцов клеток МСF-7 через 24 ч после трансфекции *wSnail1*. Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов; в – влияние *wSnail1* на транскрипционную активность рецептора эстрогена α (*ERα*) (репортерный анализ); г – колониеобразующий тест. Клетки через 24 ч после трансфекции *wSnail1* облучали УФ и рассевали на 6-луночный планшет, окраску колоний проводили через 10–14 сут. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Fig. 2. Transfection of *wSnail1* and sensitivity of MCF-7 cells to tamoxifen and ultraviolet (UV) irradiation. Transfection with control plasmid *pc3* and *wSnail1* plasmid: а – cells 24 h after transfection were cultured in the presence of 5 μM tamoxifen for 3 days and the number of viable cells was determined by MTT assay; б – immunoblotting of MCF-7 cell samples 24 h after transfection. Results from one of three independent experiments are presented; в – effect of *wSnail1* on estrogen receptor α (*ERα*) transcriptional activity (reporter assay); г – colony-forming test. The cells were exposed to UV 24 h after *wSnail1* transfection and seeded on 6-well plates; the colonies were stained after 10–14 days. Mean values ± standard deviation of three independent experiments are presented

ров [16]. Существуют довольно противоречивые данные о связи облучения и гормональной устойчивости. Согласно результатам исследований, в случае РМЖ облучение либо не приводит к изменению показателей общей выживаемости при ER-отрицательном РМЖ, либо сопровождается лишь незначительным их увеличением [1, 2], в то время как при ER-положительном РМЖ подобной тенденции не обнаружено [3–5]. В работах на культивируемых *in vitro* клетках РМЖ продемонстрировано, что облучение может (в зависимости от дозы и продолжительности воздействия) вызывать нарушения гормонального аппарата клеток, в том числе частичную потерю ERα и развитие резистентности к антиэстрогенам [6, 7]. Обнаружена корреляция между возникновением приобретенной радиорезистентности и гормональной

резистентностью клеток РМЖ, что в целом подтверждает возможность нарушения гормонального сигналинга на фоне облучения [17–20].

В настоящей работе УФ-облучение использовалось в качестве экспериментальной модели для изучения реакции опухолевых клеток на повреждения ДНК. Мы исследовали изменения эстрогенового сигналинга и уровень экспрессии ключевых сигнальных белков в клетках гормонозависимого РМЖ МСF-7 после однократного и хронического облучения. Как и ожидалось, однократное облучение приводит к активации белков апоптотического сигналинга (p53, cPARP) наряду со снижением экспрессии белков пролиферативного каскада (CDK4, CDK6). При этом наблюдается выраженная активация ключевого антиапоптотического белка – протеинкиназы Akt и основного

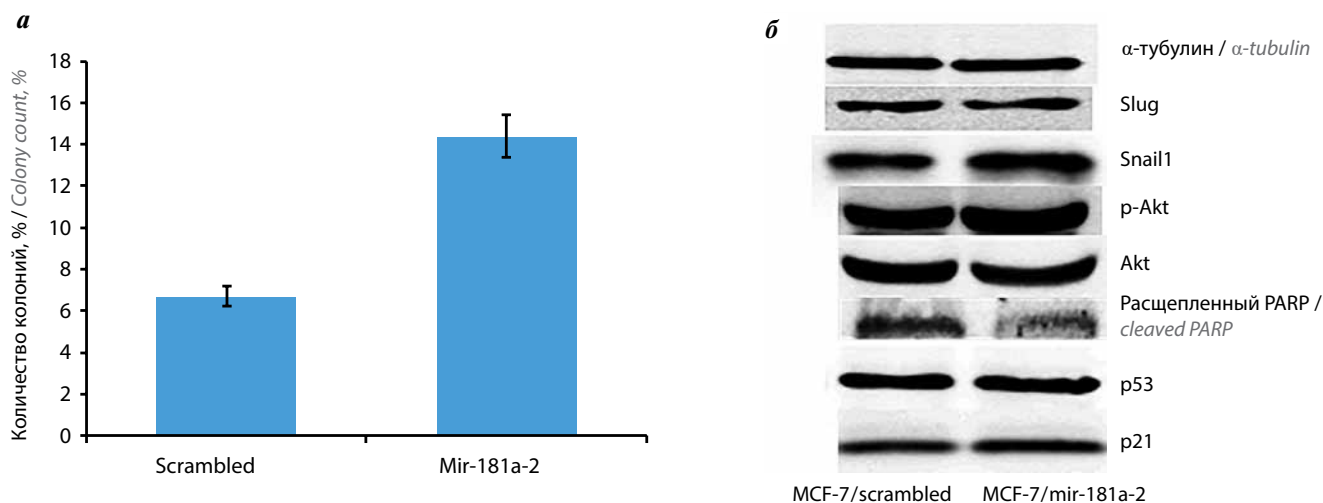


Рис. 3. МикроРНК-181а-2 (*mir-181a-2*) и чувствительность клеток МСF-7 к облучению. Клетки трансфицировали микроРНК-scrambled (случайная последовательность) и *mir-181a-2*. Иммуноблоттинг образцов клеток МСF-7 через 24 ч после трансфекции (а). Представлены результаты одного из трех независимых экспериментов. Колониеобразующий тест (б). Через 24 ч после трансфекции клетки облучали ультрафиолетом (УФ), окраску колоний проводили через 10–14 сут. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов (Fig. 3. MicroRNA-181a-2 (*mir-181a-2*) and the sensitivity of MCF-7 cells to irradiation. Cells were transfected with microRNA-scrambled (random sequence) and *mir-181a-2*. Immunoblotting of MCF-7 cell samples 24 h after transfection (a). Results from one of three independent experiments are presented. Colony-forming test (b). Cells were irradiated with ultraviolet (UV) 24 h after transfection, and colony staining was performed 10–14 days later. Mean values ± standard deviation of three independent experiments are presented

регулятора эпителиально-мезенхимального перехода Snail1.

Как известно, повторяющиеся циклы облучения приводят к селекции резистентных клонов опухолевых клеток, устойчивых к облучению [21–23]. Аналогичную картину мы наблюдали в случае УФ-облучения: в условиях хронического облучения клеток МСF-7 формируется УФ-устойчивый пул, что было описано выше. Полученные подобным образом УФ-резистентные клетки отличались низкой активностью ERα и повышенной устойчивостью к действию антиэстрогенов [12]. В настоящей работе мы впервые описали эффект гиперэкспрессии Snail1 в УФ-резистентных клетках и в экспериментах по трансфекции Snail1-содержащей плазмиды продемонстрировали непосредственное участие Snail1 в развитии перекрестной резистентности клеток к гормональным соединениям.

Следует отметить, что в опубликованной ранее работе по влиянию УФ-облучения на клетки меланомы мы также обнаружили эффект активации Snail1 в облученных клетках на фоне подавления эстрогенового сигналинга [8]. Это в определенной степени свидетельствует об общих закономерностях в изменении Snail1 и эстрогенового сигналинга в облученных клетках. Косвенным подтверждением координированной регу-

ляции Snail1 и ERα явились эксперименты по трансфекции микроРНК-181а-2, основанные на описанной ранее способности последней вызывать инактивацию ER и приводить к частичному снижению гормональной зависимости клеток [15]. Мы продемонстрировали выраженную активацию Snail1 в клетках после трансфекции микроРНК-181а-2, сопровождающуюся развитием относительной УФ-резистентности, что позволяет рассматривать активацию Snail1 под действием облучения в качестве одного из факторов, участвующих в дерегуляции эстрогенового сигналинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные показывают, что Snail1 является одним из белков, активируемых в облученных клетках, и демонстрируют его участие в инактивации эстрогенового аппарата в условиях хронического облучения клеток. В свою очередь, одновременная активация Akt и Snail1 как в УФ-резистентных клетках, так и в клетках, трансфицированных микроРНК-181а-2, сопровождается развитием резистентности и к облучению, и к гормональным соединениям, что свидетельствует о необходимости координированной активации этих белков при формировании перекрестной резистентности клеток.

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

- Eaton B.R., Jiang R., Torres M.A. et al. Benefit of adjuvant radiotherapy after breast-conserving therapy among elderly women with T1–T2N0 estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer* 2016;122(19):3059–68. DOI: 10.1002/cncr.30142 PMID: 27328114
- Yang P.S., Chen C.M., Liu M.C. et al. Radiotherapy can decrease locoregional recurrence and increase survival in mastectomy patients with T1 to T2 breast cancer and one to three positive nodes with negative estrogen receptor and positive lymphovascular invasion status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77(2):516–22. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.05.016
- Hughes K.S., Schnaper L.A., Bellon J.R. et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: long-term follow-up of CALGB 9343. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2382–7. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2615
- Chen J.X., Zhang W.W., Dong Y. et al. The effects of postoperative radiotherapy on survival outcomes in patients under 65 with estrogen receptor positive tubular breast carcinoma. *Radiat Oncol* 2018;13(1):226. DOI: 10.1186/s13014-018-1177-9.
- Chesney T.R., Yin J.X., Rajae N. et al. Tamoxifen with radiotherapy compared with Tamoxifen alone in elderly women with early-stage breast cancer treated with breast conserving surgery: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2017;123(1):1–9. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.02.019
- Paulsen G.H., Strickert T., Marthinsen A.B. et al. Changes in radiation sensitivity and steroid receptor content induced by hormonal agents and ionizing radiation in breast cancer cells *in vitro*. *Acta Oncol* 1996;35(8):1011–9. DOI: 10.3109/02841869609100720
- Bravata V., Cava C., Minafra L. et al. Radiation-induced gene expression changes in high and low grade breast cancer cell types. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1084. DOI: 10.3390/ijms19041084
- Шеголев Ю.Ю., Карпухина М.А., Сорокин Д.В. и др. Хроническое ультрафиолетовое облучение индуцирует развитие устойчивой резистентности клеток меланомы к противоопухолевым препаратам. *Успехи молекулярной онкологии* 2023;10(3):50–8. Shchegolev Yu.Yu., Karpukhina M.A., Sorokin D.V. et al. Continuous ultraviolet irradiation induces the development of irreversible resistance of melanoma cells to anticancer drugs. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):50–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-50-58
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Vincent T., Neve E.P., Johnson J.R. et al. A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2009;11(8):943–50. DOI: 10.1038/ncb1905
- Shchegolev Yu., Sorokin D., Scherbakov A. et al. Upregulation of Akt/Raptor signaling is associated with rapamycin resistance of breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2020;330:109243. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109243
- Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Razuvaeva V.E. et al. DNA damage agents result in the irreversible block of estrogen receptor α signaling and progression of hormonal resistance in receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. 2023. (Unpublished data). (In press.).
- Tokunaga E., Kimura Y., Mashino K. et al. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer* 2006;13(2):137–44. DOI: 10.2325/jbcs.13.137
- Nicolini A., Ferrari P., Kotlarova L. et al. The PI3K-AKT-mTOR pathway and new tools to prevent acquired hormone resistance in breast cancer. *Curr Pharm Biotechnol* 2015;16(9):804–15. DOI: 10.2174/138920101609150715141545
- Andreeva O.E., Sorokin D.V., Mikhaevich E.I. et al. Towards unravelling the role of ER α -targeting miRNAs in the exosome-mediated transferring of the hormone resistance. *Molecules* 2021;26(21):6661. DOI: 10.3390/molecules26216661
- Wang Y., Chen Q., Jin S. et al. Up-regulation of P-glycoprotein is involved in the increased paclitaxel resistance in human esophageal cancer radioresistant cells. *Scand J Gastroenterol* 2012;47(7):802–8. DOI: 10.3109/00365521.2012.683042
- Steelman L.S., Navolanic P., Chappell W.H. et al. Involvement of Akt and mTOR in chemotherapeutic- and hormonal-based drug resistance and response to radiation in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2011;10(17):3003–15. DOI: 10.4161/cc.10.17.17119
- Jang H., Baek J., Nam K.S. et al. Determination of the optimal time for tamoxifen treatment in combination with radiotherapy. *Int J Oncol* 2016;49(5):2147–54. DOI: 10.3892/ijo.2016.3687
- Luzhna L., Lykkesfeldt A.E., Kovalchuk O. et al. Altered radiation responses of breast cancer cells resistant to hormonal therapy. *Oncotarget* 2015;6(3):1678–94. DOI: 10.18632/oncotarget.3188
- Chen X., Ma N., Zhou Z. et al. Estrogen receptor mediates the radiosensitivity of triple-negative breast cancer cells. *Med Sci Monit* 2017;23:2674–83. DOI: 10.12659/msm.904810
- Cabrera-Licona A., Perez-Anorve I.X., Flores-Fortis M. et al. Deciphering the epigenetic network in cancer radioresistance. *Radiother Oncol* 2021;159:48–59. DOI: 10.1016/j.radonc.2021.03.012
- Podralska M., Ciesielska S., Kluiver J. et al. Non-coding RNAs in cancer radiosensitivity: microRNAs and lncRNAs as regulators of radiation-induced signaling pathways. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1662. DOI: 10.3390/cancers12061662
- Zhang H., Si J., Yue J. et al. The mechanisms and reversal strategies of tumor radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021;147(5):1275–86. DOI: 10.1007/s00432-020-03493-3

Вклад авторов

Д.В. Сорокин: иммуноблоттинг, статистическая обработка данных;

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

О.Е. Андреева: репортерный анализ, проведение исследований на клеточных культурах, МТТ-анализа и колониеобразующего теста;

Д.И. Сальникова: отбор клеток с устойчивостью к УФ-облучению, проведение колониеобразующего теста;

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

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

Authors' contributions

D.V. Sorokin: immunoblotting, statistical data processing;

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

O.E. Andreeva: reporter gene assays, conducting research on cell cultures, MTT assay and colony-forming test;

D.I. Salnikova: selection of UV-resistant cells, colony-forming test;

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

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

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

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

Д.И. Сальникова / D.I. Salnikova: <https://orcid.org/0000-0002-0809-3710>

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

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

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

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123>

Молекулярный профиль вируса Эпштейна–Барр у представителей четырех этносов России: типы вируса, варибельность гена *LMP1* и злокачественные опухоли

К. В. Смирнова^{1,2}, А. К. Лубенская¹, Н. Б. Сенюта¹, Т. Е. Душенькина¹, В. Э. Гурцевич¹¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115452 Москва, Каширское шоссе, 24;²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117998 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6**Контакты:** Владимир Эдуардович Гурцевич gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Введение. Обнаружение 2 типов вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) – ВЭБ 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов, – различающихся по трансформирующим способностям, стимулировало их изучение в различных популяциях с целью выяснения связи со злокачественными новообразованиями.

Цель исследования – изучение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей четырех этносов России, сиквенный анализ онкогена *LMP1* в изолятах вируса и поиск корреляции между типами ВЭБ и заболеваемостью определенными типами злокачественных опухолей.

Материалы и методы. Из тотальной ДНК, полученной из смывов полости рта адыгейцев, калмыков, татар и славян, жителей республик Адыгея, Калмыкия и Татарстан и Московской области, амплифицировали ДНК ВЭБ; ее наличие и концентрацию анализировали методом гнездовой полимеразной цепной реакции и каждый продукт исследовали на тип вируса и вариант *LMP1*. Типы ВЭБ, обнаруженные у представителей этих 4 этносов, сопоставляли с показателями заболеваемости населения названных республик и Московской области злокачественными опухолями, среди которых могут встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи.

Результаты. Обнаружено, что более высокая заболеваемость раком желудка и лимфомами у населения Татарстана и Московской области (по сравнению с населением Адыгеи и Калмыкии) коррелировала с доминированием у представителей этих этносов – татар и славян – ВЭБ 1-го типа, обладающего трансформирующим потенциалом *in vitro*. У адыгейцев преобладал нетрансформирующий тип ВЭБ-2, а калмыки были инфицированы обоими типами вирусов примерно в равном соотношении. Однако различия между показателями заболеваемости опухолями в сравниваемых группах оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$). Обнаруженный спектр вариантов *LMP1*, а также результаты их сиквенного анализа свидетельствуют о генетическом родстве штаммов ВЭБ, циркулирующих в изучаемых этносах.

Заключение. Изучение изолятов ВЭБ, впервые проведенное у представителей 4 этносов одной страны, показало различие в распределении в них типов этого вируса, но связи с заболеваемостью опухолями не выявило.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, типы вируса Эпштейна–Барр, латентный мембранный белок 1, сиквенный анализ, адыгейцы, калмыки, татары, славяне, полимеразная цепная реакция в реальном времени, злокачественные опухоли

Для цитирования: Смирнова К. В., Лубенская А. К., Сенюта Н. Б. и др. Молекулярный профиль вируса Эпштейна–Барр у представителей четырех этносов России: типы вируса, варибельность гена *LMP1* и злокачественные опухоли. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):116–23. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123>

Molecular profile of Epstein–Barr virus in representatives of four ethnic groups of Russia: virus types, *LMP1* gene variability and malignancies

K. V. Smirnova^{1,2}, A. K. Lubenskaya¹, N. B. Senyuta¹, T. E. Dushenkina¹, V. E. Gurtsevitch¹¹Research Institute of Carcinogenesis of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;²The Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117998, Russia

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

Rationale. The discovery of two Epstein–Barr virus (EBV) types, EBV-1 and EBV-2, which differ in their transforming abilities stimulated their study in various populations in order to elucidate the relationship with malignant neoplasms.

Aim. To study EBV-1 and EBV-2 in representatives of four ethnic groups of Russia, sequence analysis of the *LMP1* oncogene in virus isolates, and search for a correlation between the types of EBV and the incidence of certain types of malignant tumors in four ethnic groups.

Materials and methods. From total DNA obtained from oral washings of Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs, representatives of 3 Russian republics and the Moscow region, EBV DNA was amplified; its presence and concentration were analyzed by nested PCR, and each product was examined for the virus type and *LMP1* variant. Types of EBV found in representatives of In four ethnic groups were compared with the incidence rates of malignant tumors, among which EBV-associated cases may occur, in population of three republics and the Moscow region.

Results. It was observed that higher gastric cancer and lymphomas morbidity among Tatarstan and Moscow region populations (compared to populations of Adygea and Kalmykia) correlated with predominance in these ethnic groups – Tatars and Slavs – EBV-1 type having transforming potential *in vitro*. In Adygeis, non-transforming EBV-2 type was prevalent, and Kalmyks were infected with both types in approximately equal proportion. However, differences between tumor morbidities between the compared groups were statistically insignificant ($p > 0.05$). The identified spectrum of *LMP1* variants, as well as the results of their sequencing, show genetic relations between EBV strains circulating in the studied ethnic groups.

Conclusion. Study of EBV isolates for the first time performed in 4 ethnic groups of this country showed differences in distribution of the types of this virus but there was no correlation with tumor morbidity.

Keywords: Epstein–Barr virus, Epstein–Barr virus types, latent membrane protein 1, sequence analysis, Adyge, Kalmyks, Tatars, Slavs, real-time polymerase chain reaction, malignant tumors

For citation: Smirnova K.V., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B. et al. Molecular profile of Epstein–Barr virus in representatives of four ethnic groups of Russia: virus types, *LMP1* gene variability and malignancies. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):116–23. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123>

ВВЕДЕНИЕ

Открытие двух генотипов вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) – ВЭБ 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов – стимулировало их изучение в различных популяциях с целью выяснения связи со злокачественными новообразованиями. Эти типы различаются по гену *EBNA-2*, у которого между 1-м и 2-м типом имеется только 54 % гомологии. Более детальный анализ геномов ВЭБ показал, что у двух типов вируса большинство изменений локализуется в последовательностях не только *EBNA2*, но и генов *EBNA3A*, *-B* и *-C* [1]. Фенотипическое же различие между этими типами вируса заключается в способности ВЭБ-1, в отличие от ВЭБ-2, трансформировать В-лимфоциты *in vitro* [2]. Недавние эксперименты показали, что хотя лимфобластные клеточные линии (LCL), инфицированные ВЭБ-2, растут медленнее, чем инфицированные ВЭБ-1, оба типа вируса у мышей СВН индуцируют В-клеточные лимфомы [3].

Дальнейшее изучение названных типов ВЭБ позволило выявить их различия не только по трансформирующим активностям, но и по степени убиквитарности в разных группах населения. Действительно, число зараженных лиц каждым типом этого вируса в разных популяциях существенно варьирует. Совокупные данные многих исследований показывают, что население европейской расы инфицировано ВЭБ-1 примерно в 74 % случаев, ВЭБ-2 – в 19 %, обоими типами вируса – в 11 %. Изучение здоровых лиц азиатского происхождения продемонстрировало анало-

гичное распределение пациентов в зависимости от наличия у них того или иного типа ВЭБ с еще большим преобладанием ВЭБ-1 (85, 4 и 11 % соответственно) [4–6]. Однако существуют данные, свидетельствующие о довольно широком распространении ВЭБ-2 среди определенных групп населения. В частности, D. van Vaarle и соавт. выявили, что у 50 % пациентов, на протяжении длительного времени асимптоматически инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), присутствует ВЭБ-2 [7]. У больных неходжкинской лимфомой, у которых наблюдались прогрессирование ВИЧ-инфекции и синдром приобретенного иммунного дефицита (СПИД), инфицирование ВЭБ-2 оказалось еще выше: 62 и 53 % соответственно. Вирус Эпштейна–Барр 2-го типа встречался и у здоровых лиц. В США в смывах полости рта у случайно отобранных доноров г. Мемфиса в 41 % случаев обнаружен ВЭБ-1, в 50 % – ВЭБ-2 [8].

На основе генетического разнообразия гена *LMP1*, который демонстрирует большую степень полиморфизма, чем большинство других генов вируса, изоляты ВЭБ вне зависимости от типа были отнесены к различным вирусным штаммам [9]. В ходе изучения взаимосвязи между типом ВЭБ и наличием делеций в гене *LMP1* было обнаружено, что почти все изоляты китайского происхождения относятся к ВЭБ-1 и содержат делецию 30 п. н. с характерными а. к. заменами в его белковом варианте (*LMP1*) [10]. Однако, в отличие от китайских изолятов, вирусные изоляты, полученные от лиц из других географических регионов,

демонстрировали преимущественную ассоциацию делеции 30 п. н. в *LMPI* с ВЭБ-2. Эта связь была особенно очевидной в Африке, где широко распространен ВЭБ-2. Превалирование этого типа ВЭБ с делецией 30 п. н. в гене *LMPI* выявлено также в японской популяции [11]. Существует мнение, что большинство молекулярных полиморфизмов, обнаруженных в изолятах ВЭБ здоровых носителей вируса, с одинаковой частотой встречаются и в вирус-ассоциированных опухолях лиц того же географического региона [12].

На основании имеющихся данных литературы можно сделать вывод, что различная распространенность ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди населения разных стран, здоровых лиц и больных злокачественными опухолями, обусловлена многими факторами, но, по-видимому, главным образом генетическими особенностями популяций. Исходя из этого, изучение опухоль-специфических свойств каждого из типов вируса имеет смысл проводить среди этносов, представляющих генетически однородные группы населения.

Цель исследования — изучение распространенности типов ВЭБ у представителей 4 этносов России (адыгейцев, калмыков, татар и славян), различающихся генетически, и что важно, из разных климатогеографических территорий страны. Задачи исследования состояли в сиквенсном анализе гена *LMPI* в циркулирующих штаммах вируса и определении вариантов его онкобелка, а также в поиске корреляции между обнаруженными типами ВЭБ у представителей 4 этносов и показателями заболеваемости новообразованиями, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Изучены смывы полости рта представителей 4 этносов России: 59 адыгейцев (25 мужчин и 34 женщины из г. Майкоп, Республика Адыгея), 49 калмыков (19 мужчин и 31 женщины из г. Элиста, Республика Калмыкия), 60 татар (15 мужчин и 45 женщин из г. Казань, Республика Татарстан) и 40 славян (19 мужчин и 21 женщины из Московской области (МО)). Все участники исследования были практически здоровыми лицами и являлись представителями соответствующего этноса не менее чем в 3 поколениях. Каждый смыв состоял из суспензии клеток, полученных индивидуально после полоскания полости рта в течение 30 с 15 мл стерильного физиологического раствора. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре +4 °С не более 2 сут до исследования.

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMPI*. Из клеток смывов полости рта, собранных после центрифугирования, выделяли тотальную ДНК методом фенол-хлороформной депротеинизации. Наличие и концентрацию ДНК ВЭБ, амплифицированную из образцов тотальной ДНК, анализировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), описанным нами ранее [13]. Амплификацию гена *LMPI* проводили

в 2 этапа с внешними и внутренними праймерами по ранее принятой нами методике [14]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке QIAGEN (QIAquick PCR Purification kit, cat. 28104, Германия) согласно инструкции производителя. Для реакции использовали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. Для положительного контроля применяли ДНК, выделенную из используемой в качестве стандарта клеточной линии B95–8, а для отрицательного контроля — воду.

Типирование вируса Эпштейна–Барр методом гнездовой полимеразной цепной реакции гена *EBNA-2*. Типирование изолятов ВЭБ на ВЭБ-1 и ВЭБ-2 проводили с помощью гнездовой ПЦР, следуя описанному ранее методу [15] с незначительными модификациями. Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность и отсутствие перекрестной реактивности с геномом человека и другими вирусами или микроорганизмами [16].

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта изучаемых лиц определяли с помощью ПЦР-РВ по методике, описанной в работе Y.M. Lo и соавт. [17]. Для определения числа копий использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК — 1 копия вирусной ДНК [18]. Детали проведения реакции описаны нами ранее [19].

Секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции *LMPI*. Ампликоны *LMPI* секвенировали в обоих направлениях. Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator, v. 3.1 (США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (США). Обработку данных секвенирования выполняли с помощью программ Chromas 230 и Vector NT (Invitrogen, США).

Классификация *LMPI*. Нуклеотидные последовательности образцов *LMPI*, амплифицированные из изолятов ВЭБ смывов полости рта и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись анализу с помощью известной в литературе классификации R.N. Edwards и соавт. [20].

Статистический анализ. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта лиц в исследуемых группах оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медиан с межквартильным интервалом (25-й и 75-й процентиля). С помощью точного теста Фишера рассчитывали значение *p* при сравнении числа лиц, инфицированных ВЭБ-1 или ВЭБ-2; различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05. Вычисления проводили с помощью статистических пакетов Statistica for Window 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр полости рта. В нашем исследовании распространенность ВЭБ-1

и ВЭБ-2 впервые была изучена у представителей 4 этносов из одной и той же страны, России: адыгейцев, калмыков, татар и славян. Полученные результаты свидетельствует о том, что представители всех этносов являются вирусоносителями ВЭБ, поскольку у большинства из них в смывах полости рта обнаружены копии ДНК данного вируса. При этом концентрации ВЭБ были невысокими (табл. 1). Об этом свидетельствуют медианы чисел копий ДНК вируса на 1 клетку смыва (от 0,0000 до 0,0109), различия между которыми у представителей этнических групп были статистически недостоверными ($p < 0,05$).

Типы вируса Эпштейна–Барр. ДНК ВЭБ, амплифицированную из тотальной ДНК клеточной суспензии смывов полости рта участников исследования, тестировали на принадлежность к ВЭБ-1 или ВЭБ-2. Пример тестирования вируса представлен на рис. 1.

Результаты тестирования показали, что ВЭБ-1 доминировал в группах славян и татар (81 % (30/37) и 83 % (30/37) соответственно), а в группе адыгейцев преобладал ВЭБ-2 (81 % (48/52)) (рис. 2). В группе калмыков соотношение лиц, инфицированных каждым типом вируса, было практически одинаковым (ВЭБ-1 – 51 % (25/49), ВЭБ-2 – 49 % (24/49)). В группах калмыков, славян и татар инфицированы обоими типами ВЭБ оказались по 1 испытуемому.

Полиморфизм образцов гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр. Нуклеотидные последовательности гена LMP1, транслированные в аминокислотные, позволили для каждого образца онкобелка LMP1 установить его вариант на основе классификации R.N. Edwards и соавт. [20]. Обнаруженные варианты LMP1, а также результаты их секвенирования представлены в табл. 2. Согласно приведенным в ней данным низко трансформирующий вариант В-95.8 был характерен для

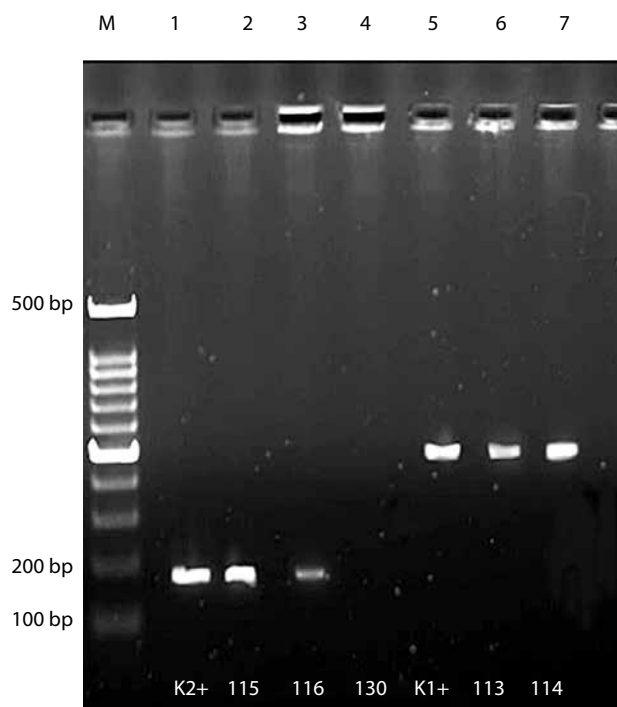


Рис. 1. Результаты обнаружения вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и его типирования на ВЭБ 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов с помощью гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ожидаемые размеры продуктов гнездовой ПЦР составляли 497 п. н. (ВЭБ-1) и 165 п. н. (ВЭБ-2). Дорожки: М – 100 bp маркер; 1 – позитивный контроль на ВЭБ-2; 2 и 3 – образцы 115 и 116 ВЭБ-2-положительны; 4 – образец 130 ВЭБ-1 и ВЭБ-1-отрицателен; 5 – положительный контроль на ВЭБ-1; 6 и 7 – образцы 113 и 114 ВЭБ-1-положительны

Fig. 1. Results of identification of Epstein–Barr virus (EBV) and its typing for type 1 EBV (EBV-1) and type 2 EBV (EBV-2) using nested polymerase chain reaction (PCR). Anticipated sizes of nested PCR products were 497 bp (EBV-1) and 165 bp (EBV-2). Lanes: M – 100 bp marker; 1 – positive control for EBV-2; 2 and 3 – samples 115 and 116 are EBV-1 positive; 4 – sample 130 is EBV-1 and EBV-2 negative; 5 – positive control for EBV-1; 6 and 7 – samples 113 and 114 are EBV-1 positive

Таблица 1. Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр полости рта адыгейцев, калмыков, татар и славян

Table 1. Epstein–Barr virus infection of the oral cavity of Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs

| Представители этносов России Representatives of Russian ethnic groups | Число обследованных лиц, n Number of investigated persons, n | М/Ж M/F | Средний возраст, лет Average age, years | Число копий ДНК вируса на 1 клетку смыва полости рта, медиана (межквартильный интервал) Number of virus DNA copies per cell of oral washings, median (interquartile range) |
|--|---|------------|--|---|
| Адыгейцы (Республика Адыгея) Adygeans (Republic of Adygeya) | 58 | 24/34 | 41,4 | 0,0000 (0,0001–0,0041) |
| Калмыки (Республика Калмыкия) Kalmyks (Republic of Kalmykia) | 48 | 18/29 | 21,4 | 0,0109 (0–0,2211) |
| Татары (Республика Татарстан) Tatars (Republic of Tatarstan) | 60 | 15/45 | 21,5 | 0,000 (0–0,0090) |
| Славяне (Московская область) Slavs (Moscow Region) | 40 | 21/19 | 47,5 | 0,0100 (0–0,2570) |

Примечание. М – мужчины; Ж – женщины.

Note. M – men; W – women.

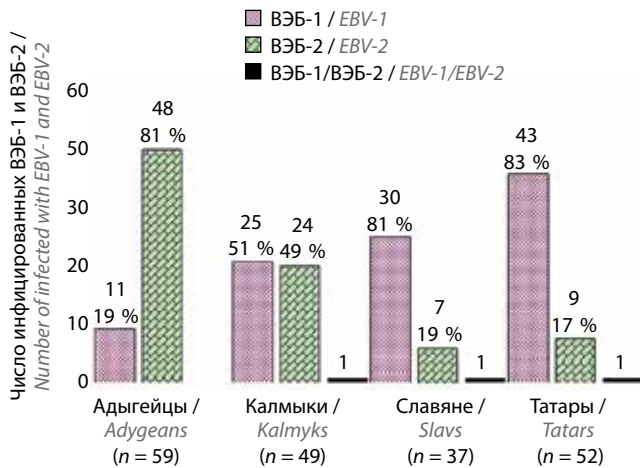


Рис. 2. Соотношение вируса Эпштейна–Барр 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов в смывах полости рта этнических адыгейцев, калмыков, татар и славян. Цифры над столбиками указывают число обследованных, у которых обнаружен ВЭБ

Fig. 2. The detected ratio of the Epstein–Barr virus of the first (EBV-1) and second (EBV-2) types in oral washings of ethnic Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs. The number of infected with detected EBV types

100 % изолятов адыгейцев. Этот же вариант LMP1 был широко представлен у калмыков (75,9 %; 22/29) и сла-

вян (82,5 %; 33/40), в меньшей степени – у татар (34,1 %; 14/41). Вариант China1 (аналог высокотрансформирующего китайского варианта Cao) выявлен у представителей калмыков в 17,2 % (5/29), славян – в 7,5 % (3/40) и татар – в 9,8 % (4/41). У представителей этих же этнических групп обнаружен вариант Mediterranean– (Med–) в 3,4 % (1/29), 2,5 % (1/40) и 14,6 % (6/41) случаев соответственно, а вариант North Carolina (NC) – только у калмыков (в 3,4 % (1/29) случаев) и славян (7,5 % (3/40) случаев).

У представителей татар из 41 образца по той же классификации варианты LMP1 были определены в 24 случаях. При этом, как показано в табл. 2, вариант LMP1-B95.8 обнаружен в 34,1 % (14/41) случаев, LMP1-China-1 – в 9,8 % (4/41) и Med– – в 14,6 % (6/41).

Остальные 17 из 41 (41,5 %) образцов LMP1 не могли быть интерпретированы с помощью упомянутой классификации, что позволило отнести их к образцам вне классификации. В составе 24 идентифицированных вариантов LMP1 обнаружены 8 образцов (8/24; 3,0 %), которые характеризовались сочетанным содержанием делеций 5 а. к. в кодонах 312–316 и 382–386, не характерных ни для одного из известных нам вариантов LMP1. Эта группа, относящаяся к конкретному этносу –

Таблица 2. Полиморфизм LMP1 в изолятах вируса Эпштейна–Барр из смывов полости рта адыгейцев, калмыков, татар и славян

Table 2. LMP1 polymorphism in Epstein–Barr virus isolates from oral washings of Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs

| Обследованные лица Investigated persons | Число выделенных образцов LMP1, абс. (%) Number of obtained LMP1 samples, abs. (%) | Варианты LMP1 по классификации R.N. Edwards и соавт. [18], n (%) LMP1 variants by classification of R.N. Edwards et al. [18], n (%) | | | | Варианты LMP1, не входящие в классификацию R.N. Edwards и соавт. [18], n (%) LMP1 variants out of classification of R.N. Edwards et al. [18], n (%) | Мутации в областях STAR гена LMP1, n (%) Mutations in STAR regions of the LMP1 gene, n (%) | | |
|---|---|--|-------------|-------------|------------|--|---|--|--|
| | | B95.8 | China-1 | Med– | NC– | | STAR1 191–232 | STAR2 351–386 | STAR3 275–330 |
| Адыгейцы (Республика Адыгея) Adygeans (Republic of Adygeya) (n = 58) | 29/58 (50,0) | 29/29 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | – | S229T 2/29 (6,9) | S366T 1/29 (3,4) | S309T/N 2/29 (6,9) |
| Калмыки (Республика Калмыкия) Kalmyks (Republic of Kalmykia) (n = 48) | 29/50 (58,0) | 22/29 (75,9) | 5/29 (17,2) | 1/29 (3,4) | 1/29 (3,4) | – | S229T 2/29 (6,9) | S366A/T 6/29 (20,7) | S309/N 8/29 (16,9) Q322E/T 7/29 (24,1) |
| Татары (Республика Татарстан) Tatars (Republic of Tatarstan) (n = 60) | 41/60 (69,5) | 14/41 (34,1) | 4/41 (9,8) | 6/41 (14,6) | 0 (0) | 17/41 (41,5 %) | S229T 8/41 (19,5) | S366A/T 22/41 (53,6) | S309N 2/41 (4,9) Q322N/E 9/41 (22,0) |
| Славяне (Московская область) Slavs (Moscow region) (n = 40) | 40/40 (100) | 33/40 (82,5) | 3/40 (7,5) | 1/40 (2,5) | 3/40 (7,5) | – | 0 (0) | S366/T 19/40 (47,5) L338S 7/40 (17,5) | S309N; 4/40 (10,0) Q322N/E/T 7/40 (17,5) E328Q 4/12 (30,0) |

татарам – и обозначенная как LMP1-Tat^K (Татарстан-Казань), заслуживает дальнейшего изучения.

Сиквенсный анализ трех транс-активирующих доменов С-терминальной области изучаемых образцов LMP1 показал наличие в этих доменах важных ключевых мутаций. В частности, в домене STAR1 у образцов LMP1, принадлежащих представителям адыгейцев, калмыков и татар, выявлена мутация в кодоне 229 (S→T) в 6,9; 6,9 и 19,5 % случаев соответственно. В домене STAR2 образцы LMP1 у представителей всех 4 изучаемых этносов содержали мутации в кодоне 366 (S→A/T) в диапазоне в 3,4–53,6 % случаев. В домене STAR3 образцы LMP1 представителей всех этносов также содержали мутацию в кодоне 309 (S→T/N) с частотой 4,9–16,9 % случаев. В этом же домене у представителей калмыков, татар и славян выявлена мутация в кодоне 322 (Q→N/E/T) (в 24,1; 22,0 и 17,5 % случаев соответственно) и только в группе славян в 30 % случаев (4/12) обнаружена мутация в кодоне 328 (E→Q). На основании данных полиморфизма и результатов сиквенсного анализа образцов LMP1 представителей адыгейцев, калмыков и татар можно сделать вывод, что циркулирующие в этих группах штаммы ВЭБ обладают генетическим родством. Несмотря на то что штаммы ВЭБ славянского происхождения характеризовались отсутствием в LMP1 мутаций в домене STAR1 и увеличенным числом мутаций в доменах STAR2 и STAR3, с учетом остальных показателей их

также можно отнести к штаммам, генетически близким к таковым у представителей 3 других этносов.

Типы вируса Эпштейна–Барр и заболеваемость опухолями. Для определения того, влияют ли типы ВЭБ на уровень злокачественных новообразований, показатели заболеваемости у населения 3 республик и МО опухолями, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные новообразования, сравнивали с данными распространенности типов ВЭБ у представителей этих этносов (адыгейцев, калмыков, татар и славян).

В состав анализируемых новообразований были включены опухоли желудка, полости рта, глотки и лимфомы, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи. Результаты анализа представлены на рис. 3. Стандартизованные показатели заболеваемости на 100 тыс. населения за 2020 г. [21] опухолями полости рта и глотки у населения 3 республик и МО были невысокими: от 7 до 38 на 100 тыс. человек. Заболеваемость лимфомами и раком желудка характеризовалась значительно более высокими показателями. При этом их значения для населения Республики Татарстан (95 и 121 случай соответственно) и МО (103 и 125 случаев соответственно) коррелировали с доминированием у представителей этих регионов трансформирующего *in vitro* ВЭБ-1. В Республике Адыгея, представители которой инфицированы преимущественно нетрансформирующим типом ВЭБ (ВЭБ-2), и Республике Калмыкия, представители которой инфицированы обоими типами вируса в равных соотношениях, наблюдались более низкие показатели заболеваемости этими же формами опухоли (81 и 72 случая и 50 и 63 случая на 100 тыс. населения соответственно). Однако статистический анализ показал, что различия между показателями заболеваемости лимфомами и раком желудка у населения Республики Татарстан и МО, с одной стороны, и республик Адыгея и Калмыкия, с другой, были статистически недостоверными ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании инфицированность ВЭБ-1 и ВЭБ-2 была впервые изучена у представителей 4 этносов, живущих в республиках Адыгея, Калмыкия, Татарстан и МО, расположенных на территориях, различающихся географически и климатически. Неодинаковый характер инфицированности двумя типами ВЭБ, обнаруженный у здоровых представителей данных этносов, и отсутствие (кроме единичных случаев) в этих группах лиц с двойной инфекцией позволяют предположить, что на процесс распространения типов ВЭБ оказывает влияние совокупность факторов. Среди них большую роль, по-видимому, играют генетические особенности популяций, типы главного комплекса гистосовместимости, состояние иммунной системы, факторы окружающей среды, особенности быта и, не исключено, кулинарные предпочтения. Вероятно, по этой же причине население европеоидной расы инфицировано преимущественно ВЭБ-1,

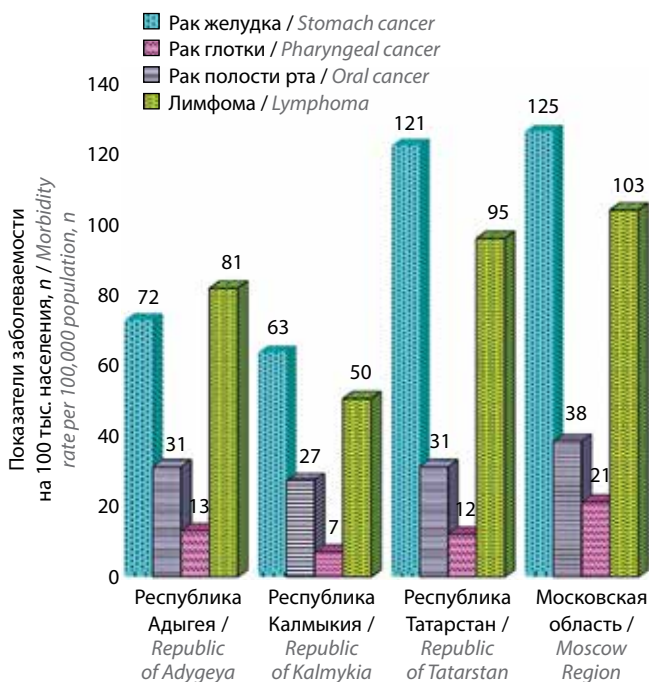


Рис. 3. Показатели заболеваемости злокачественными опухолями, в том числе ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр, у населения республик Адыгея, Калмыкия, Татарстан и Московской области [21]
Fig. 3. Incidence rates of malignant tumors with Epstein–Barr virus-associated cases in population of the Republics of Adygeya, Kalmykia, Tatarstan and the Moscow Region [21]

а население некоторых стран Африки – ВЭБ-2 [22]. Этими же факторами, по-видимому, обусловлены многообразие морфологических форм опухолей, ассоциированных с ВЭБ, и преобладание некоторых из них у определенных групп населения или целых этносов. Оказывает ли каждый из типов вируса влияние на клиническое течение ВЭБ-ассоциированных опухолей, их чувствительность к проводимой терапии и прогноз – вопросы, которые требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленное своеобразие распределения ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей 4 этносов не обнаружило связи с заболеваемостью ВЭБ-ассоциированными опухолями у населения республик Адыгея, Калмыкия, Татарстан и МО, представляющих изучаемые этносы. Однако необходимо отметить, что попытки обнаружить существование вариантов ВЭБ, специфически связанных с конкретными опухолями, предпринима-

лись многими исследователями, но до сих пор ни к чему не привели. Тем не менее полностью исключить существование штаммов ВЭБ, этиологически причастных к возникновению определенных новообразований человека, нельзя. Изолированный от китайского больного раком носоглотки штамм ВЭБ М-81, обладающий высокой склонностью к эпителиотропизму, может стать одним из вирусов, ассоциированных с опухолями эпителиального происхождения [23]. В связи с этим поиски вариантов ВЭБ и его типов, специфических для определенных типов опухолей среди различных этносов, представляются задачей оправданной, хотя и довольно сложной из-за гетерогенности генов ВЭБ. Обнаружение в России типов ВЭБ с конкретной органной онкотропностью является, на наш взгляд, актуальным вопросом, поскольку в перспективе его решение способствовало бы созданию эффективной вакцины для борьбы с соответствующими новообразованиями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sample J., Young L., Martin B. et al. Epstein–Barr virus types 1 and 2 differ in their *EBNA-3A*, *EBNA-3B*, and *EBNA-3C* genes. *J Virol* 1990;64(9):4084–92. DOI: 10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990
- Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987;61(5):1310–7. DOI: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987
- Romero-Masters J.C., Huebner S.M., Ohashi M. et al. B cells infected with type 2 Epstein–Barr virus (EBV) have increased NFATc1/NFATc2 activity and enhanced lytic gene expression in comparison to type 1 EBV infection. *PLoS Pathog* 2020;16(2):e1008365. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008365. eCollection 2020
- Correa R.M., Fellner M.D., Alonio L.V. et al. Epstein–Barr virus (EBV) in healthy carriers: distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol* 2004;73(4):583–8. DOI: 10.1002/jmv.20129
- Apolloni A., Sculley T.B. Detection of A-type and B-type Epstein–Barr virus in throat washings and lymphocytes. *Virology* 1994;202(2):978–81. DOI: 10.1006/viro.1994.1422
- Srivastava G., Wong K.Y., Chiang A.K. et al. Coinfection of multiple strains of Epstein–Barr virus in immunocompetent normal individuals: reassessment of the viral carrier state. *Blood* 2000;95(7):2443–5. DOI: 10.1182/blood.V95.7.2443
- van Baarle D., Hovenkamp E., Kersten M.J. et al. Direct Epstein–Barr virus (EBV) typing on peripheral blood mononuclear cells: no association between EBV type 2 infection or superinfection and the development of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999;93(11):3949–55. DOI: 10.1182/blood.V93.11.3949
- Sixbey J.W., Shirley P., Chesney P.J. et al. Detection of a second widespread strain of Epstein–Barr virus. *Lancet* 1989;2(8666):761–5. DOI: 10.1016/S0140-6736(89)90829-5
- Walling D.M., Brown A.L., Etienne W. et al. Multiple Epstein–Barr virus infections in healthy individuals. *J Virol* 2003;77(11):6546–6550. DOI: 10.1128/jvi.77.11.6546-6550.2003
- Cheung S.T., Leung S.F., Lo K.W. et al. Specific latent membrane protein 1 gene sequences in type 1 and type 2 Epstein–Barr virus from nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *Int J Cancer* 1998;76(3):399–406. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19980504)76:3<399::aid-ijc18>3.0.co;2-6
- Oshima M., Azuma H., Okuno A. High prevalence of Epstein–Barr virus type A strain with the 30 b.p. deletion of the latent membrane protein-1 gene in a Japanese population. *Pediatr Int* 1999;41(5):490–5. DOI: 10.1046/j.1442-200x.1999.01122.x
- Khanim F., Yao Q.Y., Niedobitek G. et al. Analysis of Epstein–Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 1996;88(9):3491–501. DOI: 10.1182/blood.V88.9.3491.bloodjournal8893491
- Смирнова К.В., Сеньюта Н.Б., Ботезату И.В. и др. Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):65–74. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V. et al. Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):65–74. (in Russ). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3
- Hahn P., Novikova E., Scherback L. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int J Cancer* 2001;91(6):815–21. DOI: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w
- Rocio H., White L.R., Stefanoff C.G. et al. Epstein–Barr Virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol* 2006;1:17. DOI: 10.1186/1746-1596-1-17
- Salahuddin S., Khan J., Azhar J.B. et al. Prevalence of Epstein–Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(11):3153–9. DOI: 10.31557/APJCP.2018.19.11.3153
- Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T. et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein–Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(21):5452–55.
- Lawrence J.B., Villave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence

and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 1988;52(1):51–61.

DOI: 10.1016/0092-8674(88)90530-2

19. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant KRAS. *Anal Biochem* 2011;419(2):302–8. DOI: 10.1016/j.ab.2011.08.015
20. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology* 1999;261(1):79–95. DOI: 10.1006/viro.1999.9855
21. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петрова. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskii, G.V. Petrova. M.: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2021. (In Russ.).
22. Young L.S., Yao Q.Y., Rooney C.M. et al. New type B isolates of Epstein–Barr virus from Burkitt’s lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol* 1987;68(Pt. 11):2853–62. DOI: 10.1099/0022-1317-68-11-2853
23. Tsai M.H., Raykova A., Klinke O. et al. Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein–Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep* 2013;5(2):458–70. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.012

Вклад авторов

К.В. Смирнова: организация исследования, анализ полученных данных, редактирование;

А.К. Лубенская: детекция типов ВЭБ, определение концентрации ДНК ВЭБ в плазме;

Н.Б. Сенюта: систематизация результатов исследования, анализ гуморального ответа к ВЭБ;

Т.Е. Душенькина: сбор и обработка биологического материала, проведение реакции иммунофлуоресценции;

В.Э. Гурцевич: идея, написание текста статьи, подготовка таблиц и рисунков.

Authors’ contribution

K.V. Smirnova: organization of research, analysis of the obtained data, editing;

A.K. Lubenskaya: detection of EBV types, determination of EBV DNA concentration in plasma;

N.B. Senyuta: systematization of research results, analysis of the humoral response to VEB;

T.E. Dushenkina: collection and processing of biological material, conducting an immunofluorescence reaction;

V.E. Gurevich: the idea, article writing, preparing tables and figures.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

А.К. Лубенская / A.K. Lubenskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3953-7449>

Н.Б. Сенюта / N.B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Т.Е. Душенькина / T.E. Dushenkina: <https://orcid.org/0000-0001-8279-514X>

В.Э. Гурцевич / V.E. Gurtsevitch: <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина».

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

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

Статья поступила: 19.06.2023. **Принята к публикации:** 18.09.2023.

Article submitted: 19.06.2023. **Accepted for publication:** 18.09.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-124-136>

Характеристика эффекторов адаптивного иммунитета, вовлеченных во вторичный ксеногенный иммунный ответ на клетки меланомы человека

Н.А. Персиянцева, А.А. Калинина, М.А. Замкова, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский

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

Контакты: Надежда Александровна Персиянцева nadushka99@gmail.com

Введение. В настоящее время развиваются подходы адаптивной клеточной терапии онкологических заболеваний с использованием Т-клеток, генетически модифицированных Т-клеточными рецепторами (ТКР) со специфичностью к опухолевым антигенам. Трудоемкость идентификации антигенспецифических ТКР в репертуаре пациента и отбора терапевтических рецепторов делает актуальной разработку экспериментальных стратегий генерации опухолеспецифических Т-клеток. Одной из них может быть ксеногенная иммунизация модельных животных клетками опухоли человека. Представляется привлекательной идея, что репертуар Т-клеток, стимулированный ксеногенной иммунизацией, может стать источником для поиска ТКР, пригодных для адаптивной иммунотерапии опухолей человека.

Цель исследования – анализ динамики вторичного ксеногенного ответа в модели индукции иммунного ответа у мышей на клетки меланомы человека для оценки перспектив использования ксеногенных иммунизаций для генерации опухолеспецифических Т-клеток памяти и идентификации их ТКР, подходящих для адаптивной иммунотерапии.

Материалы и методы. Мышей иммунизировали клетками меланомы человека; через 45 дней повторно вводили иммунизирующую опухоль. Динамику развития вторичного иммунного ответа *in vivo* и состав вовлеченных эффекторов адаптивного иммунитета анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В культуре *in vitro* оценивали пролиферативный ответ лимфоцитов иммунных мышей на клетки иммунизирующей и сторонней меланомы человека.

Результаты. Вторичный ксеногенный ответ характеризовался более интенсивным накоплением Т-клеток и быстрым развитием эффекторной фазы в месте введения меланомы человека. Это коррелировало с усиленным пролиферативным ответом *in vitro* лимфоцитов иммунных животных на ксеноантигены иммунизирующей опухоли. CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки памяти вносили равный вклад в развитие вторичного ответа на клетки меланомы человека, экспрессирующей молекулы антигенов гистосовместимости (human leukocyte antigens, HLA) классов I и II. При экспрессии только HLA класса I на клетках иммунизирующей ксеногенной опухоли формировались CD8⁺-клетки памяти, которые доминировали во вторичном иммунном ответе.

Заключение. Полученные нами данные подтвердили, что в ходе ксеногенной иммунизации формируется специфическая иммунологическая память к ксеноантигенам. Это указывает на возможность генерации ксеногенных ТКР, специфичных к антигенам опухоли человека, и открывает перспективы для разработки стратегий поиска среди них вариантов рецепторов, пригодных для адаптивной иммунотерапии опухолей человека.

Ключевые слова: ксеногенный иммунный ответ, ксеноантиген, Т-клетки памяти

Для цитирования: Персиянцева Н.А., Калинина А.А., Замкова М.А. и др. Характеристика эффекторов адаптивного иммунитета, вовлеченных во вторичный ксеногенный иммунный ответ на клетки меланомы человека. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):124–36. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-124-136>

Characteristics of adaptive immune effectors involved in the secondary xenogeneic immune response to human melanoma cells

N.A. Persiyantseva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, L.M. Khromykh, D.B. Kazansky

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

Contacts: Nadezhda Alexandrovna Persiyantseva nadushka99@gmail.com

Introduction. Current approaches are being developed for adoptive cancer therapy using T-cells genetically modified with T-cell receptors (TCRs) with specificity for tumor antigens. The complexities of identifying antigen-specific TCRs in a patient's repertoire and selecting therapeutic receptors necessitate the development of experimental strategies for generating tumor-specific T cells. One of such approaches could be the xenogeneic immunization of mice with human tumor cells. It seems plausible that the T cell repertoire stimulated by xenogeneic vaccination could be a source of TCRs suitable for adoptive cancer immunotherapy.

Aim. To assess the prospects for using xenogeneic immunizations to generate tumor-specific memory T cells and identify their TCRs suitable for adoptive immunotherapy, we studied the dynamics of the secondary xenogeneic response in a model of induction of an immune response in mice to human melanoma cells.

Materials and methods. Mice were immunized with human melanoma cells, and 45 days later, they were re-challenged with the immunizing tumor. The dynamics of the development of the secondary immune response *in vivo* and the composition of the involved effectors of adaptive immunity were analyzed by flow cytometry. The proliferation of lymphocytes from immune mice in response to human melanoma cells was evaluated in *in vitro* culture.

Results. The secondary xenogeneic response was characterized by a more intense accumulation of T cells and the rapid development of the effector phase at the injection site of human melanoma. This correlated with an enhanced *in vitro* proliferative response of lymphocytes from immune animals to xenoantigens of the immunizing tumor. CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells contributed equally to the development of a secondary response to human melanoma cells expressing HLA class I and II molecules. When only HLA class I was expressed on the cells of the immunizing xenogeneic tumor, CD8⁺ memory cells were formed, which dominated the secondary immune response.

Conclusion. Our findings confirmed the formation of a specific immunological memory for xenoantigens during xenogeneic immunization. This suggests the possibility of generating xenogeneic TCRs specific for human tumor antigens, which opens up opportunities to developing approaches for screening among them for receptor variants suited for adoptive immunotherapy of human cancers.

Keywords: xenogeneic immune response, xenoantigen, memory T-cells

For citation: Persiyantseva N.A., Kalinina A.A., Zamkova M.A. et al. Characteristics of adaptive immune effectors involved in the secondary xenogeneic immune response to human melanoma cells. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):124–36. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-124-136>

ВВЕДЕНИЕ

Ксеногенная трансплантация приобретает все большую актуальность в связи с растущей потребностью в донорском материале. Детальное изучение механизмов развития ксеногенного иммунного ответа имеет первостепенное значение для клинической практики, позволяет разрабатывать терапевтические подходы для подавления реакции «хозяин против трансплантата» и успешного приживления ксенотрансплантата.

Существуют несколько форм отторжения ксенотрансплантата, отличающихся по проявлениям, динамике и механизмам действия. Сверхострое отторжение развивается уже через несколько минут или часов после трансплантации и обусловлено вовлечением естественных антител и активацией системы комплемента реципиента [1]. Как правило, эту фазу удается успешно преодолеть [1, 2]. Однако в дальнейшем может развиваться отсроченное отторжение ксенотрансплантата, которое протекает в острой или хронической форме [1]. В нем участвуют гуморальные факторы; также развивается клеточный иммунный ответ с привлечением эффекторов как врожденного (макрофаги, естественные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы), так и адаптивного (CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоциты, В-клетки) иммунитета [1, 2].

Ключевую роль в первичном ксеногенном иммунном ответе играют CD4⁺-Т-лимфоциты, являющиеся первым и основным типом клеток, инфильтрирующих

отторгаемый трансплантат [1–4]. Активированные CD4⁺-Т-клетки привлекают макрофаги и NK-клетки в ксенотрансплантат и опосредуют развитие В-клеточного ксеногенного ответа [2]. Высокое соотношение CD4/CD8-Т-клеток коррелирует с коротким временем жизни ксенотрансплантата. Данный параметр был предложен в качестве суррогатного прогностического маркера [5]. В связи с этим в настоящее время в ксеногенной трансплантологии основные усилия направлены на подавление функций CD4⁺-Т-клеток и блокирование путей их взаимодействия с В-лимфоцитами и макрофагами [6–9]. Между тем подобные стратегии иммуносупрессии не всегда оказываются достаточными для успешного приживления трансплантата, что может указывать на вовлечение в ксеногенный иммунный ответ CD8⁺-Т-лимфоцитов [8]. Действительно, в ряде работ показана большая роль CD8⁺-Т-клеток в отторжении ксенотрансплантата [10–14].

Клеточный ксеногенный иммунный ответ хуже поддается контролю и подавлению терапевтическими моноклональными антителами [2], поэтому часто наступает полное отторжение ксенотрансплантата [1, 2]. Известно, что при вторичной трансплантации ксенотрансплантаты отторгаются быстрее [12], что указывает на формирование у реципиента иммунологической памяти к ксеноантигенам [8, 12, 15]. Было показано, что CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки памяти вовлекаются во вторичный иммунный ответ, однако сегодня

нет полной ясности, какая субпопуляция вносит основную вклад в его развитие [8, 12].

В настоящее время активно развиваются подходы адоптивной клеточной терапии (АКТ) онкологических заболеваний с использованием Т-клеток, генетически модифицированных ТКР с заданной специфичностью к таргетным опухолевым антигенам [16]. Однако поиск терапевтических ТКР во многом затруднен в связи с низкой частотой и небольшим разнообразием клонов опухолеспецифических Т-клеток, формирующихся естественным образом в организме пациента [17]. Различные подходы к иммунотерапии могут стимулировать развитие противоопухолевых ответов *de novo* [18], увеличивая таким образом разнообразие репертуара опухолеспецифических ТКР; однако зачастую больные слабо отвечают на противоопухолевую иммунотерапию [19]. Возможность развития ксеногенного Т-клеточного иммунного ответа и формирования специфической иммунологической памяти к ксеноантигенам натолкнула нас на идею использования ксеногенных иммунизаций для получения Т-лимфоцитов, рецепторы которых будут обладать специфичностью к антигенам опухоли человека.

Предлагаемый нами подход может быть основан на индукции у экспериментальных животных ксеногенного иммунного ответа на антигены опухоли человека с последующим анализом сформированного репертуара рецепторов Т-лимфоцитов и отбором вариантов ТКР, обладающих специфичностью к антигенам иммунизирующей опухоли. Такая стратегия потенциально может облегчить поиск терапевтических ТКР для АКТ онкологических заболеваний. Теоретически при внедрении в Т-лимфоцит человека ксеногенный ТКР может полноценно функционировать и распознавать специфичный антиген в комплексе с антигенами гистосовместимости (human leukocyte antigens, HLA) [14, 20–22].

Для оценки перспективности разработки подобного экспериментального подхода мы изучили динамику развития вторичного ксеногенного иммунного ответа и охарактеризовали основные эффекторы, вовлеченные в этот процесс. С этой целью использовали модель индукции ксеногенного иммунного ответа на клетки меланомы человека у иммунокомпетентных мышей. Наше исследование показало, что через 45 дней после первичной трансплантации опухоли человека у мышей формируется иммунологическая память. И уже через 1–3 дня после повторного введения той же меланомы у иммунизированных животных развивается интенсивный иммунный ответ, равную роль в котором играют и CD4⁺, и CD8⁺-Т-клетки памяти. Полученные результаты проясняют функцию Т-клеток памяти в возникновении вторичного ксеногенного иммунного ответа, что имеет большое фундаментальное значение. Кроме того, наша работа обладает практической ценностью, позволяет оценить перспективы разработки новых стратегий иммуно-

супрессии с целью улучшения приживления ксенотрансплантатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использовали 2 линии меланомы человека: Mtp, экспрессирующую HLA классов I и II (HLA-A3, -A26 (10), -B13, -B41), и II, экспрессирующую только HLA класса I (HLA-A23 (9), -A26 (10), -B7, -B56 (22)), из коллекции Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (табл. 1) [23–26].

Таблица 1. Характеристика клеточных линий меланомы человека Mtp и II

Table 1. Characteristics of human melanoma cell lines Mtp and II

| Клеточная линия Cell line | Источник Origin | Пас-саж Passage | Экспрессия меланомных антигенов Melanoma antigens |
|------------------------------|---|--------------------|--|
| Mtp | Меланома кожи бедра Thigh skin melanoma | 35 | CD63, HMW, MAGE |
| II | Метастаз меланомы кожи передней брюшной стенки в мягких тканях грудной клетки Metastases of the anterior abdominal wall skin melanoma in the soft tissues of the chest | >100 | CD63, HMB45, HMW, MelanA, Tyrosinase, PTA, MAGE |

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), обогащенной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), а также 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения) и 20 мМ NEPES (НПП «ПанЭко», Россия) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ до 70–80 % монослоя.

Животные и их иммунизация. Мышей линии C57BL/6 получали из экспериментально-биологической лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Для иммунизации использовали самок массой 18–20 г (6–8-недельного возраста). Животных иммунизировали путем внутрибрюшинного введения 5 × 10⁶ клеток меланомы человека линии Mtp или II (mel) в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4). Через 45 дней после иммунизации мышам повторно внутрибрюшинно вводили 5 × 10⁶ клеток соответствующей ксеногенной меланомы, которую использовали для первичной иммунизации животных. Аналогичным образом иммунизировали интактных мышей C57BL/6. Экспериментальные группы состояли из 3–4 мышей.

Подготовка клеточных суспензий. Через 1–7 дней после введения ксеногенной опухоли животных

умерщвляли методом цервикальной дислокации и извлекали лаваж брюшной полости. Для этого в их брюшную полость шприцем вводили 5 мл ледяной среды RPMI 1640 и отбирали 2 мл клеточной суспензии. Кроме того, у мышей стерильно извлекали селезенки и лимфатические узлы (ЛУ). Клетки осторожно выдавливали из стромы органов в гомогенизаторе Поттера в 3 мл PBS. Полученные суспензии клеток осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин, 4 °C), ресуспендировали в PBS, подсчитывали жизнеспособные клетки в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева и использовали для цитофлуориметрического анализа. Спленциты иммунизированных и контрольных (без предварительной иммунизации) мышей ресуспендировали в полной ростовой среде RPMI 1640 с добавлением 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола (Merck, Германия) и использовали для тестов *in vitro*. Аналогичным образом готовили суспензии клеток иммунизированных и неиммунизированных мышей без введения ксеногенной опухоли, которые использовали в качестве дополнительного контроля.

Смешанная культура лимфоцитов. Спленциты (6×10^5) mel-иммунизированных и неиммунизированных мышей (респондеры) высеивали в триплетах в 96-луночные плоскодонные плашки (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) в 100 мкл полной ростовой среды. В качестве стимуляторов использовали клетки меланомы линии Mtr или II, обработанные митомицином С (MitC, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Япония) (50 мкг/мл, 37 °C, 1 ч), с последующей трехкратной промывкой RPMI 1640 путем центрифугирования (200 g, 5 мин, 4 °C). Стимуляторы (3×10^4) вносили в культуру в 100 мкл полной ростовой среды до конечного объема 200 мкл/лунка. Для оценки фоновой пролиферации респондеры (5×10^5) культивировали в присутствии 3×10^5 сингенных спленцитов мышей C57BL/6, обработанных MitC, как указано выше. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажности в течение 72 ч. Уровень пролиферации клеток измеряли по включению ³H-тимидина (1 мкКи/лунка) («Изотоп», Россия), который вносили за 16–18 ч до окончания культивирования. Уровень пролиферативной активности клеток выражали в количестве импульсов в минуту (cpm).

Антитела. В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD3 – PerCP-Cy5.5 (клон 17A2; BioLegend, США), анти-CD8a – AlexaFluor 488 (клон 53–6.7; BD Bioscience, США), анти-CD4 – Pacific Blue (клон RM4-5; BD Bioscience, США), анти-CD44 – APC (клон IM7; BD Bioscience, США), анти-CD62L – APC-Cy7 (клон MEL-14; BD Bioscience, США), анти-CD19 – FITC (клон 6D5; BioLegend, США), анти-CD11b – PE-Cy7 (M1/70; BD Bioscience, США), анти-Gr-1 (Ly-6G) – APC (клон RB6-8C5; BioLegend, США).

Цитофлуориметрический анализ. Пробы клеток (5×10^6) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2; BD Bioscience, США) (10 мин, 4 °C)

и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами (40 мин, 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience, США) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience, США). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A. Для окрашивания мертвых клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain (Invitrogen, США). Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain и показателям светорассеяния. Оценку экспрессии поверхностных маркеров проводили в популяции живых одиночных лейкоцитов. При характеристике Т-клеток выделяли несколько функциональных подгрупп на основе экспрессии маркеров CD62L и CD44, которые определяют активационный статус и особенности миграции Т-клетки (табл. 2). Посредством CD62L Т-лимфоцит взаимодействует с клетками венул с высоким эндотелием, что обеспечивает его миграцию в лимфоидной системе. CD44⁺-Т-лимфоциты могут покинуть лимфоидную систему и мигрировать в периферические ткани. Были проанализированы не менее 1×10^5 событий в популяции CD3⁺- или CD3⁻-лимфоцитов. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США).

Таблица 2. Фенотипические характеристики различных функциональных подгрупп Т-клеток

Table 2. Phenotypic characteristics of different functional T cell subsets

| Функциональная подгруппа Functional subset | Фенотипическая характеристика Phenotypic characteristics |
|---|---|
| Наивные клетки Naive cells | CD62L ⁺ CD44 ⁻ |
| Центральные клетки памяти Central memory cells | CD62L ⁺ CD44 ⁺ |
| Эффекторы Effectors | CD62L ⁻ CD44 ⁺ |

Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Статистический анализ проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ динамики развития вторичного ксеногенного иммунного ответа *in vivo* в месте локализации ксеногенной опухоли. Для изучения динамики развития вторичного ксеногенного иммунного ответа мышам, предварительно иммунизированным клетками меланомы человека Mtr, повторно трансплантировали клетки иммунизирующей опухоли. Мышей без предварительной иммунизации, которым аналогично трансплантировали

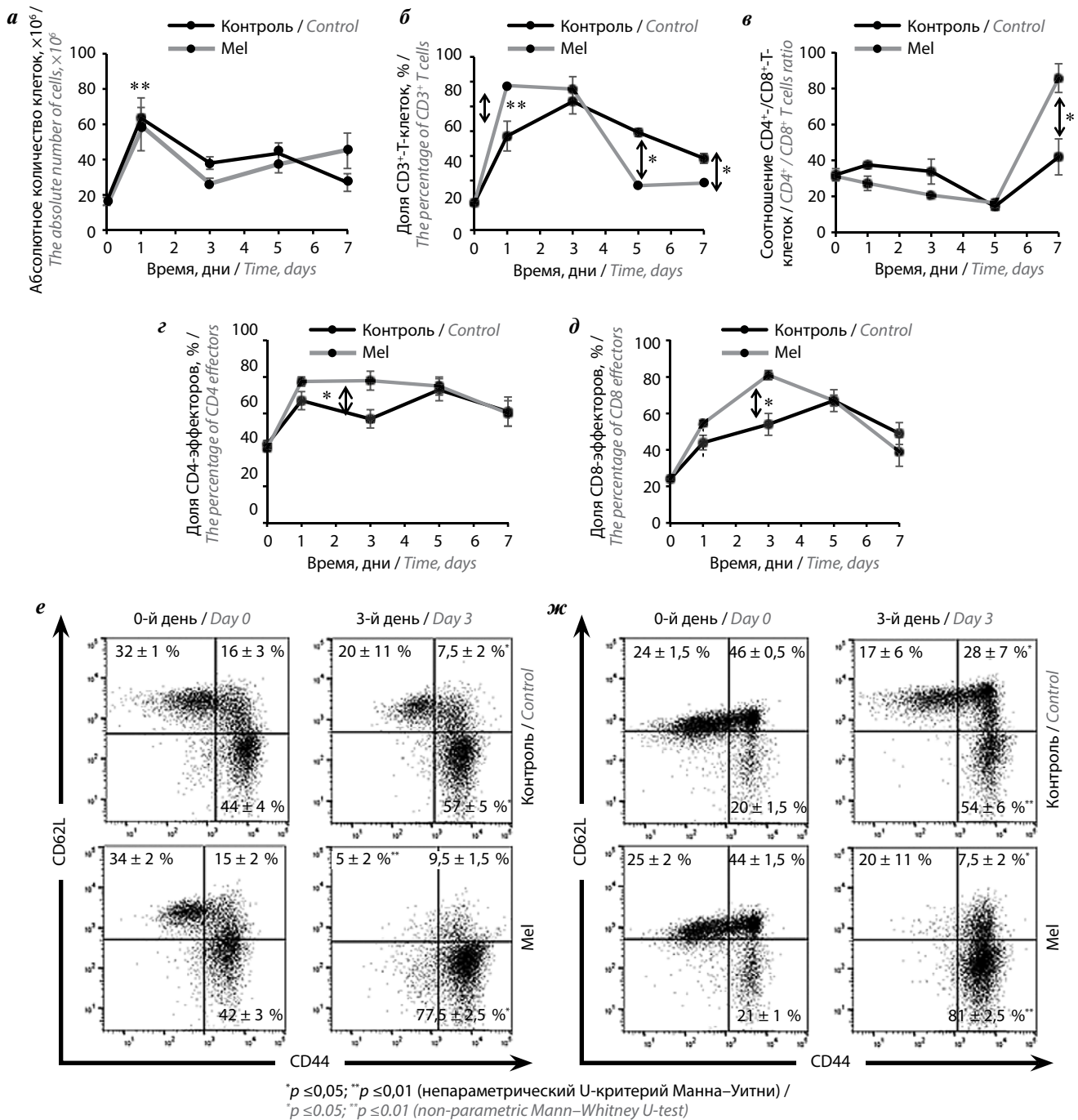


Рис. 1. Анализ динамики локального Т-клеточного ответа после вторичной трансплантации ксеногенной опухоли: а – абсолютное количество клеток ($\times 10^6$); б – относительное количество $CD3^+$ -лимфоцитов (%); в – соотношение $CD4^+$ -/ $CD8^+$ -Т-лимфоцитов; г – доля эффекторов ($CD62L^+CD44^+$) в популяции $CD4^+$ -Т-клеток (%); д – доля эффекторов ($CD62L^+CD44^+$) в популяции $CD8^+$ -Т-клеток (%); е, ж – анализ лимфоцитов с фенотипом наивных клеток ($CD62L^+CD44^-$), центральных клеток памяти ($CD62L^+CD44^+$) и эффекторов ($CD62L^+CD44^+$) в популяции $CD4^+$ - (е) и $CD8^+$ -Т-клеток (ж) на 3-й день после иммунизации. Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp (mel). Через 45 дней животным повторно внутрибрюшинно вводили меланому Mtp. Аналогичным образом трансплантировали клетки меланомы человека интактным мышам C57BL/6 (контроль). На указанные сроки после иммунизации извлекали лаваж брюшной полости и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3-4$)

Fig. 1. Analysis of the dynamics of the local T-cell response after secondary transplantation of a xenogeneic tumor: а – absolute number of cells ($\times 10^6$); б – relative number of $CD3^+$ lymphocytes (%); в – ratio of $CD4^+$ -/ $CD8^+$ T-lymphocytes; г – percentage of effectors ($CD62L^+CD44^+$) in the population of $CD4^+$ T-cells; д – percentage of effectors ($CD62L^+CD44^+$) in the population of $CD8^+$ T cells; е, ж – analysis of lymphocytes with the phenotype of naive cells ($CD62L^+CD44^-$), central memory cells ($CD62L^+CD44^+$) and effectors ($CD62L^+CD44^+$) in a population of $CD4^+$ (е) and $CD8^+$ T cells (ж) on the 3rd day after immunization. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally (i. p.) with Mtp (mel) human melanoma cells. After 45 days, the animals were re-introduced i. p. with Mtp melanoma. Similarly, human melanoma cells were transplanted into intact C57BL/6 mice (control). Lavage was removed for the indicated periods after immunization and the cells were analyzed by flow cytometry. The data were obtained in three independent experiments and are presented as mean \pm standard error of mean ($n = 3-4$)

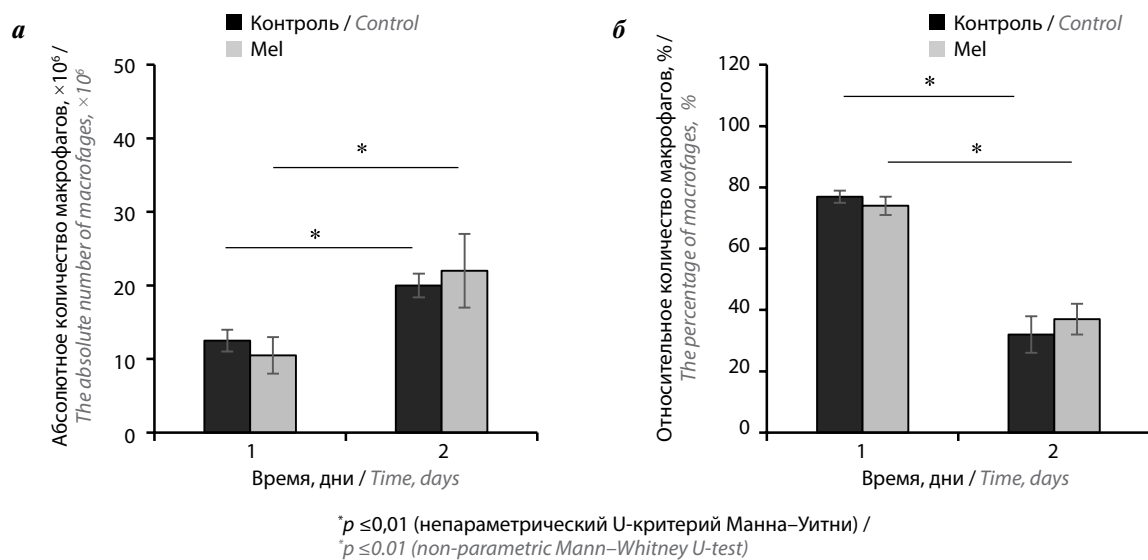


Рис. 2. Анализ локального накопления макрофагов после трансплантации ксеногенной опухоли: а — абсолютное количество макрофагов ($\times 10^6$); б — относительное количество $CD3^- Gr1^- CD11b^+$ (%). Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtr (mel). Через 45 дней животным повторно внутрибрюшинно вводили меланому Mtr. Аналогичным образом трансплантировали клетки меланомы человека интактным мышам C57BL/6 (контроль). Через 24 ч после иммунизации извлекали лаваж брюшной полости и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$)

Fig. 2. Analysis of local accumulation of macrophages after transplantation of a xenogeneic tumor: a — absolute number of macrophages ($\times 10^6$); б — percentage of $CD3^- Gr1^- CD11b^+$. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally (i. p.) with Mtr (mel) human melanoma cells. After 45 days, the animals were re-introduced i. p. with Mtr melanoma. Similarly, human melanoma cells were transplanted into intact C57BL/6 mice (control). Lavage was removed 24 hours after immunization and cells were analyzed by flow cytometry. Data were obtained from three independent experiments and are presented as mean \pm standard error of mean ($n = 3$)

ксеногенную опухоль, использовали в качестве контроля. Через 1–7 дней после трансплантации оценивали динамику изменения субпопуляционного состава иммунных эффекторов в месте локализации ксеногенной меланомы (в брюшной полости) (рис. 1).

Уже через 24 ч после введения ксеногенной меланомы в обеих экспериментальных группах наблюдалось резкое увеличение клеточности лаваж — в 3,5 раза по сравнению с группами без ксенотрансплантата (0-й день) ($p \leq 0,01$; см. рис. 1, а), что сопровождалось увеличением доли $CD3^+$ -Т-лимфоцитов (см. рис. 1, б). Кроме того, через 1 сут после ксеногенной иммунизации (как первичной, так и вторичной) в брюшной полости животных в 2 раза возросло абсолютное количество макрофагов по сравнению со значениями в группах без введения опухоли Mtr (0-й день) (рис. 2, а). Однако относительное количество макрофагов (клеток с фенотипом $CD3^- Gr1^- CD11b^+$ [27]) в брюшной полости контрольных и иммунизированных мышей через 24 ч после введения ксеногенной опухоли снизилось в 2 раза по сравнению с контрольными значениями (0-й день) (рис. 2, б), что может быть обусловлено интенсивной инфильтрацией Т-лимфоцитов (см. рис. 1, а). Таким образом, через сутки после трансплантации клеток ксеногенной меланомы Mtr эффекторами как первичного, так и вторичного иммунного ответа на ксеноантигены являются преимущественно Т-лимфоциты и макрофаги. На всех сроках анализа абсолютное количество клеток в брюшной полости

иммунизированных и контрольных мышей было сопоставимо (см. рис. 1, а).

Через 24 ч после трансплантации ксеногенной меланомы относительное количество $CD3^+$ -лимфоцитов в брюшной полости иммунизированных мышей было в 1,5 раза выше по сравнению с контролем ($p \leq 0,01$; см. рис. 1, б). К 5-му дню доля $CD3^+$ -Т-лимфоцитов у иммунизированных животных резко уменьшилась и стала в 2 раза ниже значения в контрольной группе: $18 \pm 1,0$ и $39,5 \pm 1,5$ % соответственно ($p \leq 0,05$) (см. рис. 1, б). На 7-й день после ксеногенной трансплантации относительное количество $CD3^+$ -лимфоцитов в брюшной полости иммунизированных мышей было в 1,5 раза ниже ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольной группой первичной ксеногенной иммунизации (см. рис. 1, б).

Для более детальной характеристики $CD3^+$ -лимфоцитов, вовлеченных в первичный и вторичный ксеногенный ответ, далее оценивали соотношение $CD4^+/CD8^+$ -Т-лимфоцитов (см. рис. 1в) и долю эффекторов ($CD62L-CD44^+$) в популяции $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-клеток на различных сроках после трансплантации ксеногенной опухоли (см. рис. 1, г, д). Через 1 и 3 дня после первичной иммунизации соотношение $CD4^+/CD8^+$ -Т-лимфоцитов в брюшной полости экспериментальных животных составило приблизительно 2:1 (см. рис. 1, е). В совокупности с увеличением доли $CD3^+$ -клеток в лаваже на данных сроках это указывает на преимущественное вовлечение $CD4^+$ -Т-лимфоцитов в первичный ксеногенный иммунный ответ,

что соответствует результатам ранее опубликованных работ [1–3].

В динамике вторичного иммунного ответа на ксеноантигены в течение первых дней после трансплантации меланомы человека наблюдалась тенденция к снижению соотношения $CD4^+/CD8^+$ -Т-лимфоцитов в брюшной полости иммунизированных мышей, которое через 24 ч после реиммунизации составило 1,4 : 1,0 (см. рис. 1, в). На пике эффекторной фазы вторичного ксеногенного иммунного ответа (3-й день после введения опухоли) соотношение этих клеток оказалось равным приблизительно 1:1 (см. рис. 1, в). При этом доля эффекторов $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов была одинаковой и составила 80 % (см. рис. 1, з, д). Это указывает на равный вклад этих клеток в развитие вторичного иммунного ответа на ксеноантигены у иммунизированных мышей. Однако к 7-му дню после введения ксеногенной опухоли соотношение $CD4^+/CD8^+$ -Т-клеток в группе иммунизированных животных резко увеличилось, в 2 раза превысив этот показатель в контрольной группе ($p \leq 0,05$; см. рис. 1, в). Относительное количество $CD4^+$ у иммунизированных мышей возросло до 73 ± 3 % по сравнению с 63 ± 6 % в контрольной группе (см. рис. 1, в). Доля $CD8^+$ в группах иммунизированных и контрольных животных составила $17 \pm 1,8$ и 31 ± 5 % соответственно (см. рис. 1, в). Это указывает на более быструю контракцию иммунного ответа $CD8^+$ -Т-клеток при вторичной ксеногенной стимуляции.

Через 24 ч после введения клеток меланомы человека Mtp в брюшной полости животных обеих экспериментальных групп не было выявлено достоверных различий в относительном количестве эффекторов $CD4^+$ (см. рис. 1, з). К 3-му дню доля эффекторов $CD4^+$ у иммунизированных мышей была в 1,3 раза выше ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольными животными (см. рис. 1, з, е). В дальнейшем наблюдалось снижение относительного количества эффекторов $CD4^+$ в группе иммунизированных животных, и на 7-й день после трансплантации ксеногенной опухоли их доля не отличалась от значений в группе мышей с первичной иммунизацией (см. рис. 1, з).

Аналогично динамике эффекторов $CD4^+$ пик ответа эффекторов $CD8^+$ у иммунизированных мышей наблюдался на 3-й день после вторичной трансплантации ксеногенной опухоли (см. рис. 1, д): доля лимфоцитов $CD8^+CD62L^-CD44^+$ в брюшной полости иммунизированных животных была в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой (мышами с первичной ксеногенной иммунизацией) ($p \leq 0,05$; см. рис. 1, д, ж). К 7-му дню доля эффекторов $CD8^+$ у реиммунизированных животных была сопоставима с контролем (см. рис. 1, д). Стоит отметить, что при развитии первичного иммунного ответа формирование пула эффекторов $CD4^+$ и $CD8^+$ происходило одновременно с сокращением доли Т-лимфоцитов с фенотипом наивных клеток и центральных клеток памяти (см. рис. 1, е, ж).

Во вторичном иммунном ответе интенсивное накопление эффекторов в брюшной полости иммунизированных мышей сопровождалось снижением доли только наивных Т-клеток (см. рис. 1, е, ж).

Анализ вовлечения вторичных иммунных органов в развитие иммунного ответа на клетки ксеногенной опухоли *in vivo*. Для изучения роли вторичных иммунных органов в развитии вторичного ксеногенного иммунного ответа мы оценили динамику изменения содержания Т-лимфоцитов в селезенке и ЛУ иммунизированных и неиммунизированных (контрольных) мышей в различные сроки после введения клеток меланомы человека Mtp (рис. 3).

Анализ Т-клеток в селезенке выявил сопоставимые изменения относительного количества $CD3^+$ -лимфоцитов в обеих экспериментальных группах после введения клеток Mtp (см. рис. 3, а). Только на 5-й день после трансплантации ксеногенной опухоли в селезенке иммунизированных мышей доля $CD3^+$ -лимфоцитов оказалась в 1,3 раза ниже ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем (см. рис. 3, а). Соотношение $CD4^+/CD8^+$ -Т-лимфоцитов в селезенке иммунизированных мышей не отличалось от контрольных значений на всех сроках наблюдения после трансплантации ксеногенной меланомы (см. рис. 3, б). Первичный и вторичный ксеногенные иммунные ответы не сопровождались накоплением эффекторов $CD4^+$ в селезенке экспериментальных животных (см. рис. 3, в). Между тем при первичной ксеногенной иммунизации к 5-му дню после введения меланомы человека количество эффекторов $CD8^+$ возросло в 2 раза по сравнению с неиммунизированными мышами без ксенотрансплантации (0-й день) (см. рис. 3, з). При вторичном ксеногенном ответе данный эффект не наблюдали, и относительное количество эффекторов $CD8^+$ в селезенке иммунизированных мышей было сопоставимо на всех сроках после трансплантации (см. рис. 3, з).

После ксеногенной иммунизации в ЛУ животных наблюдалось плавное снижение относительного количества лимфоцитов $CD3^+$, и к 7-му дню доля Т-клеток оказалась ниже в 1,6–1,7 раза ($p \leq 0,05$) в обеих экспериментальных группах по сравнению с контрольными мышами без трансплантации (0-й день) (см. рис. 3, а). Соотношение $CD4^+/CD8^+$ в ЛУ животных обеих групп было сопоставимо и не менялось на всем сроке наблюдения после иммунизации (см. рис. 3, б). При этом к 7-му дню после трансплантации ксеногенной меланомы в ЛУ как контрольных, так и иммунизированных мышей наблюдалось накопление $CD4^+$ - и $CD8^+$ -эффекторов, количество которых было в 2 и 3,5 раза больше соответственно по сравнению с группами без иммунизации ($p \leq 0,01$) (0-й день) (см. рис. 3, в, з).

Анализ вторичного иммунного ответа на ксеногенную опухоль *in vitro*. На следующем этапе работы мы оценили уровень пролиферативного ответа лимфоцитов иммунизированных мышей при рестимуляции ксеноантигенами *in vitro* (рис. 4) и охарактеризовали эффекторы,

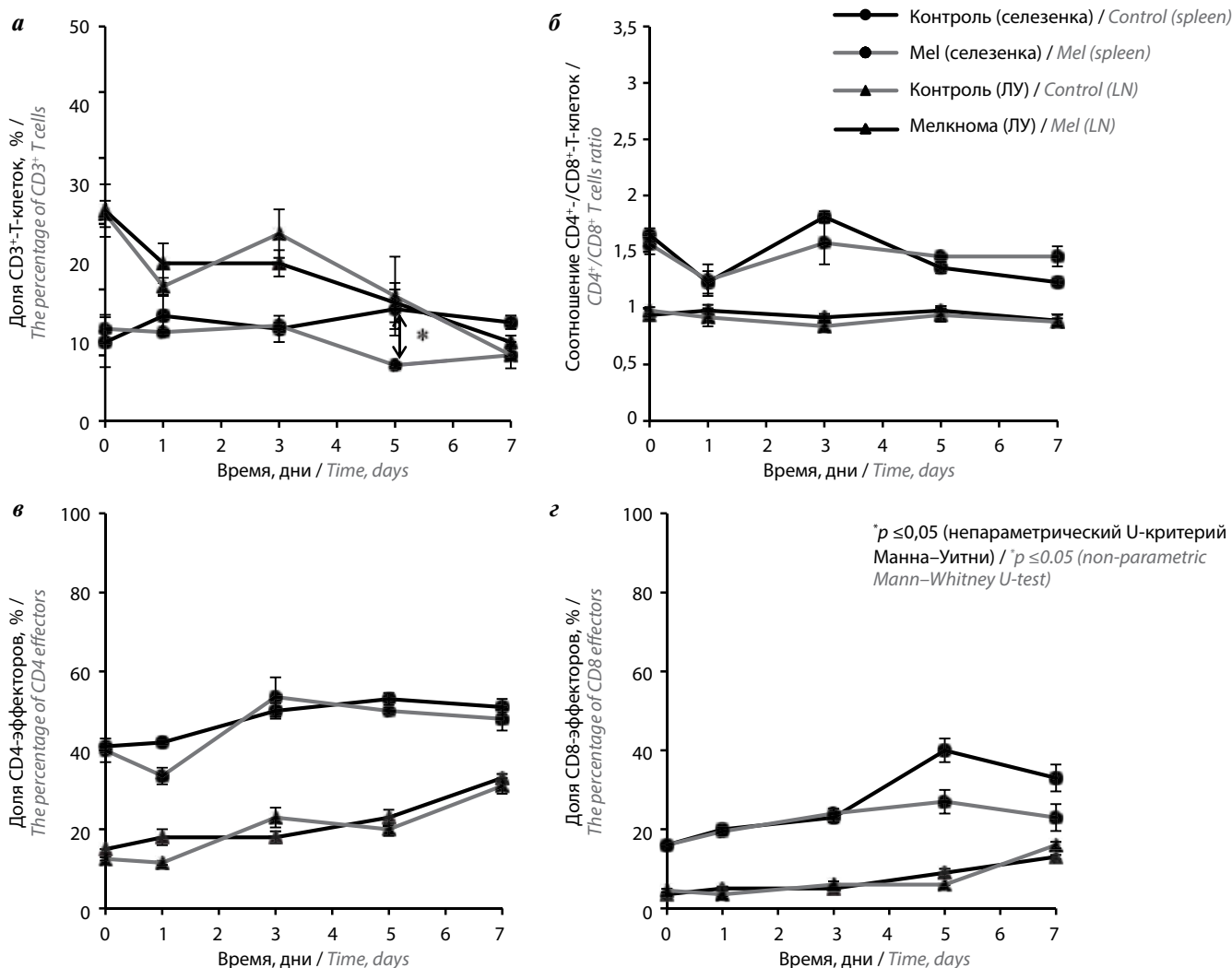


Рис. 3. Анализ динамики изменения Т-лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах мышей после вторичной трансплантации ксеногенной опухоли: а – относительное количество CD3⁺-лимфоцитов (%); б – соотношение CD4⁺/CD8⁺-Т-лимфоцитов; в – доля эффекторов (CD62L-CD44⁺) в популяции CD4⁺-Т-клеток (%); г – доля эффекторов (CD62L-CD44⁺) в популяции CD8⁺-Т-клеток (%). Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp (mel). Через 45 дней животным повторно внутрибрюшинно вводили клетки Mtp. Аналогичным образом трансплантировали клетки меланомы человека intactным мышам C57BL/6 (контроль). На указанные сроки после иммунизации извлекали селезенку и лимфатические узлы (ЛУ) и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 3–4)

Fig. 3. Analysis of the dynamics of changes in T-lymphocytes in the spleen and lymph nodes of mice after secondary transplantation of a xenogeneic tumor: а – percentage of CD3⁺-lymphocytes; б – ratio of CD4⁺/CD8⁺ T-lymphocytes; в – percentage of effectors (CD62L-CD44⁺) in the population of CD4⁺ T cells; г – percentage of effectors (CD62L-CD44⁺) in the population of CD8⁺ T cells. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally (i. p.) with Mtp (mel) human melanoma cells. After 45 days, the animals were re-introduced i. p. with Mtp cells. Similarly, human melanoma cells were transplanted into intact C57BL/6 mice (control). For the specified periods after immunization, the spleen and lymph nodes (LN) were removed and the cells were analyzed by flow cytometry. The data were obtained in three independent experiments and are presented as mean ± standard error of mean (n = 3–4)

вовлеченные в ксеногенный иммунный ответ *in vitro* (рис. 5). Для этого использовали спленоциты мышей, предварительно иммунизированных клетками меланомы человека линии П (экспрессирует HLA класса I) или Mtp (экспрессирует HLA классов I и II). Стоит отметить, что обе линии меланомы человека экспрессируют общую молекулу HLA класса I – A26 (10) [23–26]. Для индукции первичного ксеногенного иммунного ответа *in vitro* в качестве респондеров использовали клетки селезенки неиммунизированных животных.

Анализ показал, что при рестимуляции лимфоцитов мышей, иммунизированных меланомой П, клетка-

ми той же опухоли уровень пролиферации был сопоставим с уровнем ответа контрольных спленоцитов неиммунизированных мышей на ксеноантигены данной опухоли (см. рис. 4). Между тем при стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей клетками посторонней меланомы Mtp наблюдался пролиферативный ответ, который достоверно превышал уровень ответа клеток контрольных мышей, но был ниже уровня ответа животных, иммунизированных Mtp, на ксеноантигены данной меланомы (см. рис. 4).

Спленоциты мышей, иммунизированных меланомой Mtp, отвечали усиленной пролиферацией

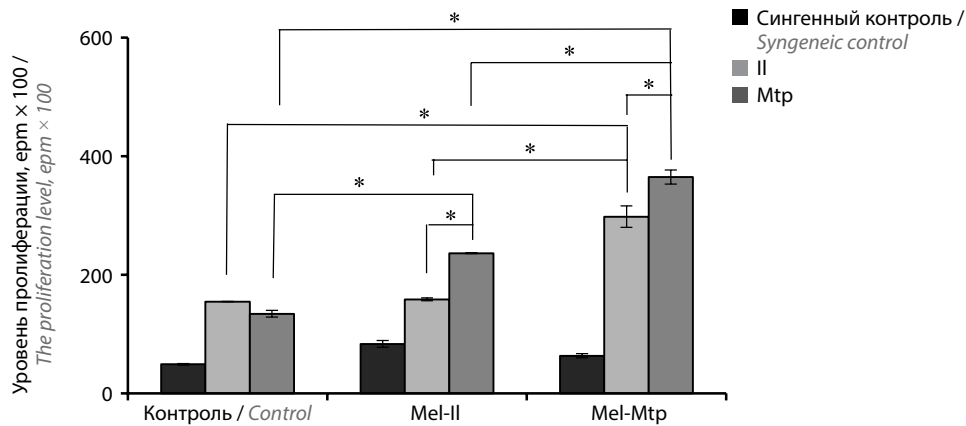


Рис. 4. Уровень пролиферативного ответа на клетки ксеногенной меланомы *in vitro*. Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp или II (*mel-Mtp* и *mel-II* соответственно). Через 45 дней извлекали спленоциты иммунизированных мышей и культивировали в присутствии клеток меланомы Mtp или II, обработанных митомицином C. В качестве контроля использовали спленоциты интактных (неиммунизированных) мышей C57BL/6. Для оценки фоновой пролиферации спленоциты мышей культивировали в присутствии сингенных клеток селезенки. Клетки культивировали *in vitro* в течение 72 ч. Пролиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 16–18 ч. Данные получены в 3 независимых экспериментах (n = 3). Результаты одного репрезентативного эксперимента представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего

Fig. 4. Proliferative response to xenogeneic melanoma cells *in vitro*. C57BL/6 mice were immunized intraperitoneally with Mtp or II human melanoma cells (*mel-Mtp* and *mel-II*). After 45 days, splenocytes from immunized mice were harvested and cultured in the presence of mitomycin C-treated Mtp or II melanoma cells. Splenocytes from intact (non-immunized) C57BL/6 mice were used as controls. To assess background proliferation, mouse splenocytes were cultured in the presence of syngeneic spleen cells. The cells were cultured *in vitro* for 72 hours. The proliferation of splenocytes was assessed by the incorporation of ³H-thymidine introduced into the culture over the last 16–18 hours. The data were obtained in three independent experiments (n = 3). Data from one representative experiment are presented as mean ± standard error of mean

при стимуляции *in vitro* клетками обеих линий меланомы. При этом уровень ответа животных, иммунизированных клетками меланомы Mtp, превышал соответствующие значения в контрольной группе и группе мышей, иммунизированных меланомой II (см. рис. 4). Как и ожидалось, полученные данные указывают на большую иммуногенность ксеногенной меланомы Mtp, экспрессирующей молекулы обоих классов HLA.

Для выявления эффекторов, вовлеченных в ксеногенный ответ *in vitro*, затем были проанализированы относительное количество В-клеток (CD19⁺) (рис. 5, а), Т-клеток (CD3⁺) (рис. 5, б) и соотношение CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток (рис. 5, в) в культуре спленоцитов иммунизированных и неиммунизированных мышей через 72 ч после стимуляции *in vitro* клетками меланомы Mtp или II.

Первичная стимуляция *in vitro* спленоцитов неиммунизированных мышей ксеноантигенами меланомы II или Mtp сопровождалась увеличением доли В-лимфоцитов в культуре (в 1,3 и 1,5 раза соответственно) (см. рис. 5, а) и снижением доли CD3⁺-Т-лимфоцитов (в 1,8 и 2,9 раза соответственно) (см. рис. 5, б). Стоит отметить, что изменение доли В- и Т-клеток не было пропорциональным, что может указывать на вовлечение в пролиферативный ответ *in vitro* эффекторов врожденного иммунитета [28, 29]. Анализ соотношения CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток показал увеличение доли CD4⁺-Т-клеток в культуре лимфоцитов неиммунизированных мышей, стимулированных ксеноантигенами меланомы Mtp (см. рис. 5, в), что согласуется с результатами экспериментов *in vivo* (см. рис. 1, в). Первичный ответ

in vitro на клетки меланомы II не сопровождался изменением соотношения CD4⁺/CD8⁺-Т-лимфоцитов в культуре спленоцитов (см. рис. 5, в).

Рестимуляция *in vitro* спленоцитов мышей, иммунизированных II, клетками той же меланомы II не вызвала изменения относительного количества В- и Т-клеток по сравнению с соответствующими значениями в культуре этих клеток без ксеногенной стимуляции (см. рис. 5, а, б). Однако при этом значительно снизилось соотношение CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток (см. рис. 5, в), что указывает на преимущественную реактивацию CD8⁺-Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных II, в ответ на антигены иммунизирующей опухоли. Культивирование спленоцитов таких животных в присутствии клеток меланомы Mtp привело к значительному (в 1,7 раза; *p* < 0,05) снижению доли CD3⁺-клеток (рис. 5, б) без изменения соотношения CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток (см. рис. 5, в). При этом доля В-лимфоцитов в культуре спленоцитов мышей, иммунизированных II и рестимулированных клетками меланомы Mtp, не отличалась от этого показателя в культуре без ксеногенной стимуляции (см. рис. 5, а). Это может указывать на пролиферацию NK-клеток *in vitro* при стимуляции клетками меланомы Mtp.

При рестимуляции *in vitro* спленоцитов мышей, иммунизированных Mtp, клетками иммунизирующей опухоли наблюдались достоверное увеличение доли В-лимфоцитов (в 1,2 раза; *p* < 0,05) (см. рис. 5, а) и снижение относительного количества Т-лимфоцитов (в 1,8 раза; *p* < 0,05) (см. рис. 5, б) по сравнению с культурой спленоцитов этих животных без ксеногенной

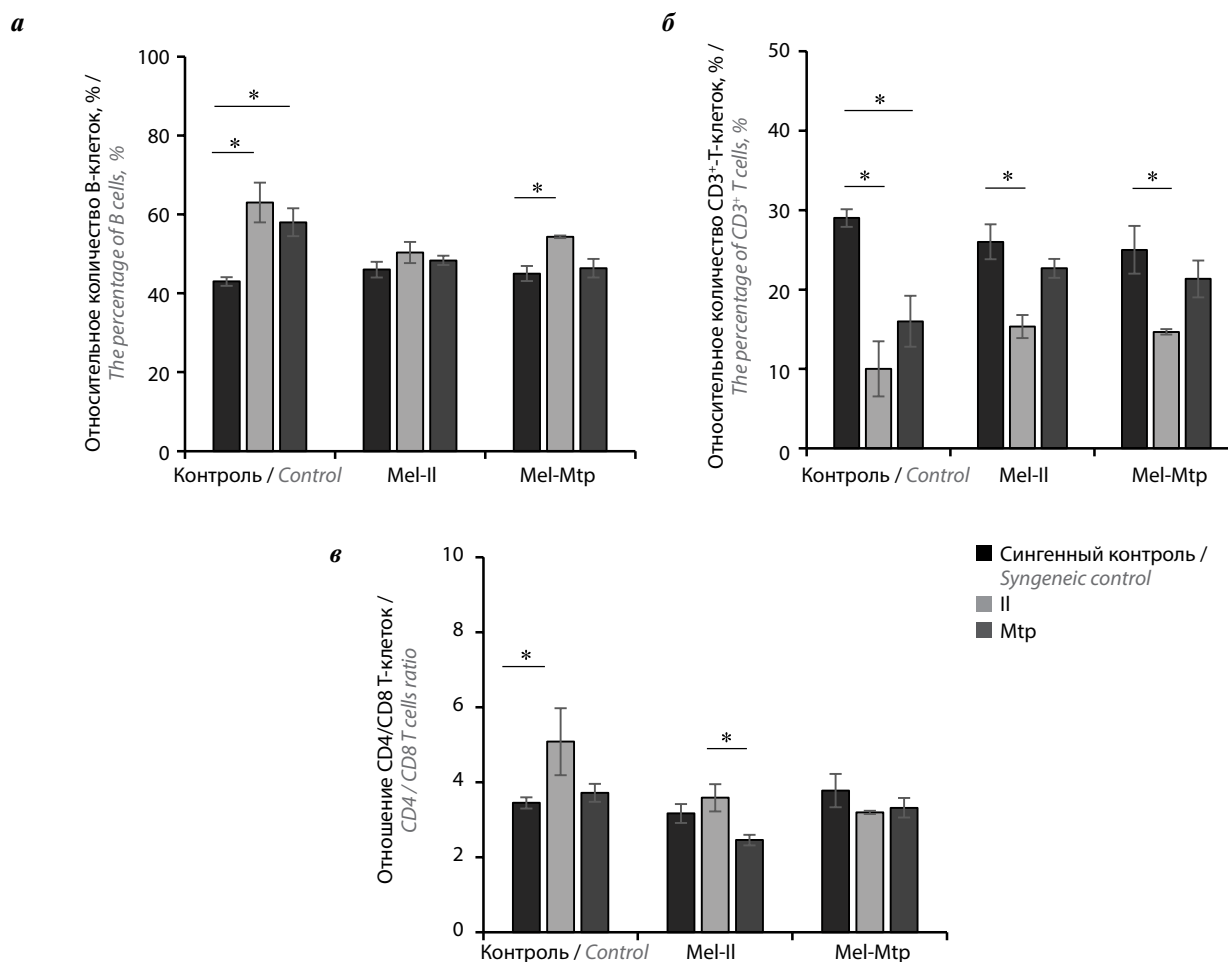


Рис. 5. Анализ эффекторов, вовлеченных во вторичный иммунный ответ на клетки ксеногенной меланомы *in vitro*: а – относительное количество лимфоцитов CD19⁺ (В-клетки) (%); б – относительное количество лимфоцитов CD3⁺ (Т-клетки) (%); в – соотношение CD4⁺ и CD8⁺-Т-клеток в популяции CD3⁺-лимфоцитов. Мышей C57BL/6 иммунизировали внутрибрюшинно клетками меланомы человека Mtp или II (mel-Mtp и mel-II соответственно). Через 45 дней извлекали спленоциты иммунизированных мышей и культивировали в течение 72 ч в присутствии клеток меланомы Mtp или II, обработанных митомицином С. Аналогичным образом культивировали клетки интактных (неиммунизированных) мышей C57BL/6 (контроль). Данные получены в 3 независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 3)

Fig. 5. Analysis of effectors involved in the secondary immune response to xenogeneic melanoma cells *in vitro*: а – percentage of CD19⁺ lymphocytes (B-cells); б – percentage of CD3⁺ lymphocytes (T-cells); в – ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in the population of CD3⁺-lymphocytes. C57BL/6 mice were immunized *i. p.* with Mtp or II human melanoma cells (mel-Mtp and mel-II). After 45 days, splenocytes from immunized mice were recovered and cultured for 72 h in the presence of Mtp or II melanoma cells treated with mitomycin C. Cells of intact (non-immunized) C57BL/6 mice (contr) were cultured in a similar manner. Data were obtained from three independent experiments and are presented as mean ± standard error of mean (n = 3)

стимуляции *in vitro*. Культивирование клеток мышей, иммунизированных Mtp, в присутствии клеток меланомы II не сопровождалось изменением соотношения В- и Т-лимфоцитов (см. рис. 5, а, б). Соотношение CD4⁺/CD8⁺-Т-клеток мышей, иммунизированных меланомой Mtp, не изменялось при обоих типах ксеногенной стимуляции (см. рис. 5, в).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в АКТ в онкологии используются Т-клетки, модифицированные ТКР или химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR), специфичным к антигенам опухоли [16, 30]. CAR-Т-клетки могут распознавать только опухолеассоциированные антигены, поэтому их при-

менение в клинической практике ограничено. Напротив, ТКР-Т-лимфоциты могут распознавать как опухолеассоциированные антигены, так и неоантигены в комплексе с HLA пациента. Это делает АКТ с использованием ТКР-модифицированных Т-клеток более универсальной и дает возможность ее применения при разных типах опухолей.

С учетом сложности идентификации антиген-специфических ТКР в репертуаре Т-лимфоцитов пациента [19, 31, 32] и трудоемкости отбора потенциально терапевтических вариантов рецепторов АКТ актуальной представляется разработка экспериментальных подходов для генерации опухолеспецифических Т-лимфоцитов. Одной из таких стратегий может быть ксеногенная иммунизация модельных животных

клетками опухоли человека. Репертуар ТКР стимулированных таким образом Т-лимфоцитов животного можно потенциально использовать для поиска рецепторов, пригодных для АКТ опухолей человека.

В ряде ранее опубликованных исследований было подтверждено формирование специфической иммунологической памяти на ксеноантигены в ходе отторжения первичного ксенотрансплантата [8, 12, 15, 33]. Чтобы оценить возможность идентификации ксеногенных ТКР, специфичных к антигенам опухоли человека, в настоящей работе мы изучили вторичный Т-клеточный ответ мышей, иммунизированных ксеноантигенами меланомы человека *in vivo*.

Наше исследование показало, что уже через 24 ч после повторного введения ксеногенной опухоли у иммунизированных мышей наблюдалось локальное интенсивное накопление Т-лимфоцитов. При этом в первичном ксеногенном ответе *in vivo* пик накопления Т-клеток по месту локализации меланомы человека наблюдался только к 3-му дню после введения ксеногенной опухоли животным (см. рис. 1, а). Локально вторичный ответ характеризовался более быстрым развитием эффекторной фазы, пик которой отмечали на 3-й день после вторичной трансплантации в отличие от 5-го дня для первичного ксеногенного иммунного ответа (см. рис. 1, з, д). Таким образом, у сенсibilизированных животных наблюдалось более быстрое развитие иммунного ответа на ксеноантигены. Это четко коррелировало с более сильным пролиферативным ответом *in vitro* лимфоцитов предварительно иммунизированных мышей на ксеноантигены иммунизирующей опухоли (см. рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении Т-клеток памяти в процессы распознавания и элиминации ксеноантигенов при вторичной трансплантации.

Анализ ксеногенного ответа *in vitro* показал, что в первичный и вторичный пролиферативные ответы вовлечены преимущественно В-лимфоциты (см. рис. 5, а). Наши данные *in vitro* согласуются с рядом работ, показавших большую роль В-клеток в развитии первичного отторжения ксенотрансплантата [6, 9, 34]. Кроме того, у сенсibilизированных реципиентов выявлено формирование донор-специфичных В-клеток памяти, которые вносили значительный вклад в отторжение вторичного трансплантата [35, 36].

При первичной стимуляции *in vitro* клетками ксеногенной опухоли, экспрессирующей молекулы HLA классов I и II (линия Mtp), наблюдалось увеличение доли CD4⁺-Т-клеток в культуре спленоцитов (см. рис. 5, в), что четко коррелировало с эффектами *in vivo* (см. рис. 1в). Полученные результаты подтверждают ранее опубликованные данные о доминирующей роли CD4⁺-Т-лимфоцитов в развитии первичного ксеногенного иммунного ответа [1, 2, 37, 38]. Стоит отметить, что активация CD4⁺-Т-лимфоцитов в ответ на ксеноантигены происходит преимущественно по непрямому пути распознавания [20, 39–41]. Между тем специфич-

ческая рестимуляция клеток памяти, сформированных в ходе первичного ответа *in vivo* на ксеноантигены HLA классов I и II (стимуляция спленоцитов Mtp-иммунизированных мышей клетками меланомы Mtp *in vitro*), не сопровождалась изменением соотношения CD4⁺/CD8⁺-Т-лимфоцитов в культуре *in vitro* (см. рис. 5, в). Это может указывать на равное вовлечение CD4⁺- и CD8⁺-клеток памяти во вторичный ксеногенный иммунный ответ, что также коррелирует с ответом *in vivo* (см. рис. 1, в).

Однако, если ксеногенные клетки экспрессируют только молекулы HLA класса I (меланома линии II), во вторичный специфический ксеногенный иммунный ответ (стимуляция спленоцитов II-иммунизированных мышей клетками II *in vitro*) вовлекаются преимущественно CD8⁺-Т-лимфоциты (см. рис. 5, в). Это указывает на формирование CD8⁺-Т-клеток памяти при развитии первичного ответа *in vivo* на ксенографт, экспрессирующий только HLA класса I. Именно CD8⁺-клетки памяти, способные к прямому распознаванию молекул HLA класса I на поверхности клеток II, пролиферируют в культуре *in vitro* при рестимуляции клетками данной меланомы. Наши данные не противоречат представлениям о реализации прямого и непрямого путей распознавания ксеноантигенов Т-лимфоцитами [2, 21, 22, 40, 42]. Более того, было показано, что последовательное блокирование прямого, а затем непрямого распознавания ксеноантигенов обеспечивает полное приживание ксенографта даже при отсутствии иной иммуносупрессивной терапии [41]. Это указывает на доминирование механизмов прямого распознавания на ранних этапах развития ксеногенного иммунного ответа. Результаты настоящего исследования также согласуются с ранее полученными данными, согласно которым в отсутствие главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса II и/или CD4⁺-Т-лимфоцитов отторжение ксенотрансплантата опосредуется цитотоксическими CD8⁺-Т-клетками [10, 43]. Наблюдавшаяся низкая интенсивность пролиферации *in vitro* лимфоцитов мышей, иммунизированных клетками меланомы II, в ответ на клетки той же меланомы (см. рис. 4) может указывать на формирование небольшого пула CD8⁺-клеток памяти в ответ на клетки ксеногенной меланомы [9].

Согласно полученным нами данным, в ходе первичного иммунного ответа на ксеноантигены *in vivo* могут формироваться как CD4⁺-, так и CD8⁺-Т-клетки памяти, которые опосредуют развитие более быстрого и интенсивного ответа при вторичной ксенотрансплантации. С учетом общего вклада CD4⁺- и CD8⁺-клеток памяти в развитие вторичного ксеногенного иммунного ответа разработка терапевтических подходов, направленных на комбинированное подавление их функций, в перспективе может улучшить показатели приживания ксенотрансплантатов, что имеет первостепенное значение для клинической трансплантологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что ксеногенные иммунизации можно использовать для генерации пула Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам человека. Между тем ксеногенный ответ, вероятно, индуцируется преимущественно на чужеродные молекулы HLA как наиболее сильный иммуноген. В связи с этим для идентификации ксеногенных ТКР, пригодных для АКТ опухолей человека, нужно разработать эффективные методы для строгого отбора рецепторов, обладающих специфичностью именно к опухолевым антигенам, а не к молекулам HLA. В перспективе необходимы тщательные исследования, которые позволят подтвердить возможность использования ксеногенных ТКР с охарактеризованной антигенной специфичностью для получения безопасных экспериментальных Т-клеточных продуктов для АКТ онкологических заболеваний.

тивные методы для строгого отбора рецепторов, обладающих специфичностью именно к опухолевым антигенам, а не к молекулам HLA. В перспективе необходимы тщательные исследования, которые позволят подтвердить возможность использования ксеногенных ТКР с охарактеризованной антигенной специфичностью для получения безопасных экспериментальных Т-клеточных продуктов для АКТ онкологических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Carvalho-Oliveira M., Valdivia E., Blasczyk R. et al. Immunogenetics of xenotransplantation. *Int J Immunogenet* 2021;48(2):120–34. DOI: 10.1111/iji.12526
- Hu M., Hawthorne W.J., Yi S. et al. Cellular immune responses in islet xenograft rejection. *Front Immunol* 2022;13:893985. DOI: 10.3389/fimmu.2022.893985
- Yi S., Feng X., Hawthorne W.J. et al. CD4⁺ T cells initiate pancreatic islet xenograft rejection via an interferon-gamma-dependent recruitment of macrophages and natural killer cells. *Transplantation* 2002;73(3):437–46. DOI: 10.1097/00007890-200202150-00019
- Davila E., Byrne G.W., LaBrecche P.T. et al. T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2006;13(1):31–40. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2005.00258.x
- Chung H., Kim H.J., Kim J.S. et al. CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio correlates with the graft fate in pig-to-non-human primate islet xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2020;27(2):e12562. DOI: 10.1111/xen.12562
- Lee F.T., Dangi A., Shah S. et al. Rejection of xenogeneic porcine islets in humanized mice is characterized by graft-infiltrating Th17 cells and activated B cells. *Am J Transplant* 2020;20(6):1538–50. DOI: 10.1111/ajt.15763
- Bucher P., Gang M., Morel P. et al. Transplantation of discordant xenogeneic islets using repeated therapy with anti-CD154. *Transplantation* 2005;79(11):1545–52. DOI: 10.1097/01.tp.0000163505.63159.69
- Wang F., Xia J., Chen J. et al. Combination of antibodies inhibits accelerated rejection mediated by memory T cells in xenoantigen-primed mice. *Xenotransplantation*. 2010;17(6):460–8. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00618.x
- Wang S., Tasch J., Kheradmand T. et al. Transient B-cell depletion combined with apoptotic donor splenocytes induces xeno-specific T- and B-cell tolerance to islet xenografts. *Diabetes* 2013;62(9):3143–50. DOI: 10.2337/db12-1678
- Yi S., Feng X., Hawthorne W. et al. CD8⁺ T cells are capable of rejecting pancreatic islet xenografts. *Transplantation* 2000;70(6):896–906. DOI: 10.1097/00007890-200009270-00007
- Uchida T., Tomita Y., Anzai K. et al. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in discordant skin xenograft rejection. *Transplantation* 1999;68(11):1721–7. DOI: 10.1097/00007890-199912150-00016
- Lin Y., Soares M.P., Sato K. et al. Rejection of cardiac xenografts by CD4⁺ or CD8⁺ T cells. *J Immunol* 1999;162(2):1206–14.
- Yin D.P., Ma L.L., Sankary H.N. et al. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the rejection of concordant pancreas xenografts. *Transplantation* 2002;74(9):1236–41. DOI: 10.1097/00007890-200211150-00007
- Tanemura M., Chong A.S., DiSesa V.J. et al. Direct killing of xenograft cells by CD8⁺ T cells of discordant xenograft recipients. *Transplantation* 2002;74(11):1587–95. DOI: 10.1097/00007890-200212150-00017
- Triponez F., Oberholzer J., Morel P. et al. Xenogeneic islet retransplantation in mice triggers an accelerated, species-specific rejection. *Immunology* 2000;101(4):548–54. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2000.00130.x
- Rotolo R., Leuci V., Donini C. et al. CAR-based strategies beyond T lymphocytes: integrative opportunities for cancer adoptive immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2019;20(11):2839. DOI: 10.3390/ijms20112839
- He J., Xiong X., Yang H. et al. Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response. *Cell Res* 2022;32(6):530–42. DOI: 10.1038/s41422-022-00627-9
- Hiam-Galvez K.J., Allen B.M., Spitzer M.H. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* 2021;21(6):345–59. DOI: 10.1038/s41568-021-00347-z
- Pilard C., Ancion M., Delvenne P. et al. Cancer immunotherapy: it's time to better predict patients' response. *Br J Cancer* 2021;125(7):927–38. DOI: 10.1038/s41416-021-01413-x
- Andres A., Toso C., Morel P. et al. Phylogenetic disparity influences the predominance of direct over indirect pathway of antigen presentation in islet xenotransplantation. *Transplant Proc* 2005;37(1):463–5. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.11.074
- Lin C.M., Gill R.G. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant* 2016;21(1):40–4. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000263
- Kim C.H., Oh K., Kim D.E. et al. Both CD45RA⁺ and CD45RO⁺ human CD4⁺ T cells drive direct xenogeneic T-cell responses against porcine aortic endothelial cells. *Xenotransplantation* 2010;17(3):224–32. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00582.x
- Барышников А.Ю., Бурова О.С., Воронина Е.С. и др. Клеточные линии меланомы человека. СПб., 2017. 174 с.
- Baryshnikov A.Yu., Burova O.S., Voronina E.S. et al. Human melanoma cell lines. Petersburg, 2017. 174 p. (In Russ.).
- Оборотова М.В., Бурова О.С., Барышникова М.А. и др. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток на клеточных линиях меланомы человека. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):11–4.
- Oborotova M.V., Burova O.S., Baryshnikova M.A. et al. Expression of tumor stem cell markers on human melanoma cell lines. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2015;14(1):11–4. (In Russ.).
- Vartanian A.A., Kosorukov V.S. Melanoma cell lines as a basis for development of a model of vasculogenic mimicry. *Biology Bulletin* 2023;50(3):259–65.
- Misyurin V.A., Misyurin A.V., Lukina A.E. et al. Cancer-testis gene expression profile in human melanoma cell lines. *Bochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 2014;8(3):240–4.
- Komohara Y., Jinushi M., Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci* 2014;105(1):1–8. DOI: 10.1111/cas.12314
- Lu T.Y., Xu X.L., Du X.G. et al. Advances in innate immunity to overcome immune rejection during xenotransplantation. *Cells* 2022;11(23):3865. DOI: 10.3390/cells11233865

29. Maeda A., Kogata S., Toyama C. et al. The innate cellular immune response in xenotransplantation. *Front Immunol* 2022;13:858604. DOI: 10.3389/fimmu.2022.858604
30. D'Ippolito E., Schober K., Nauerth M. et al. T cell engineering for adoptive T cell therapy: safety and receptor avidity. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(10):1701–12. DOI: 10.1007/s00262-019-02395-9
31. Goncharov M.M., Bryushkova E.A., Sharaev N.I. et al. Pinpointing the tumor-specific T cells *via* TCR clusters. *Elife* 2022;11:e77274. DOI: 10.7554/eLife.77274
32. Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Shugay M. et al. Detecting T cell receptors involved in immune responses from single repertoire snapshots. *PLoS Biol* 2019;17(6):e3000314. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000314
33. Peng Y., Chen J., Shao W. et al. Xenoreactive CD4⁺ memory T cells resist inhibition by anti-CD44 mAb and reject islet grafts *via* a Th2-dependent pathway. *Xenotransplantation* 2011;18(4):252–61. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2011.00646.x
34. Kang H.K., Wang S., Dangi A. et al. Differential role of B cells and IL-17 *versus* IFN- γ during early and late rejection of pig islet xenografts in mice. *Transplantation* 2017;101(8):1801–10. DOI: 10.1097/TP.0000000000001489
35. Yamamoto T., Li Q., Hara H. et al. B cell phenotypes in baboons with pig artery patch grafts receiving conventional immunosuppressive therapy. *Transpl Immunol* 2018;51:12–20. DOI: 10.1016/j.trim.2018.08.005
36. Xu H., Chilton P.M., Tanner M.K. et al. Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients. *Blood* 2006;108(10):3611–9. DOI: 10.1182/blood-2006-04-017467
37. Tahara H., Ide K., Basnet N. et al. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. *Xenotransplantation* 2010;17(3):188–96. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00575.x
38. Kim S.C., Mathews D.V., Breeden C.P. et al. Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion. *Am J Transplant* 2019;19(8):2174–85. DOI: 10.1111/ajt.15329
39. Singh N.P., Guo L., Que X. et al. Blockade of indirect recognition mediated by CD4⁺ T cells leads to prolonged cardiac xenograft survival. *Xenotransplantation* 2004;11(1):33–42. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2004.00079.x
40. Plenter R.J., Grazia T.J., Doan A.N. et al. CD4 T cells mediate cardiac xenograft rejection *via* host MHC class II. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(9):1018–24. DOI: 10.1016/j.healun.2012.05.018
41. Mirenda V., Golshayan D., Read J. et al. Achieving permanent survival of islet xenografts by independent manipulation of direct and indirect T-cell responses. *Diabetes*. 2005;54(4):1048–55. DOI: 10.2337/diabetes.54.4.1048
42. Li S., Anwar I.J., Canning A.J. et al. Xenorecognition and costimulation of porcine endothelium-derived extracellular vesicles in initiating human porcine-specific T cell immune responses. *Am J Transplant* 2023;2023(7):904–19. DOI: 10.1016/j.ajt.2023.04.006
43. Devos T., Yan Y., Segers C. et al. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the rejection of heart or islet xenografts in recipients with xenotolerance in the innate immune compartment. *Transplant Proc* 2005;37(1):516–7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.12.012

Вклад авторов

Н.А. Персиянцева: проведение экспериментов, анализ результатов, статистический анализ, написание текста статьи;
 А.А. Калинина: написание текста статьи, обзор литературы по теме статьи, анализ полученных данных;
 М.А. Замкова, Д.Б. Казанский: разработка дизайна исследования, редактирование;
 Л.М. Хромых: анализ полученных данных, редактирование.

Authors' contributions

N.A. Persiyantseva: conducting experiments, analyzing results, statistical analysis, article writing;
 A.A. Kalinina: article writing, literature review on the topic of the article, analysis of the data obtained;
 M.A. Zamkova, D.B. Kazansky: research design development, editing;
 L.M. Khromykh: analysis of the received data, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.А. Персиянцева / N.A. Persiyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-2097-5986>
 А.А. Калинина / A.A. Kalinina: <https://orcid.org/0000-0002-6912-5579>
 М.А. Замкова / M.A. Zamkova: <https://orcid.org/0000-0002-4687-7444>
 Л.М. Хромых / L.M. Khromykh: <https://orcid.org/0000-0002-5793-0271>
 Д.Б. Казанский / D.B. Kazansky: <https://orcid.org/0000-0002-4179-8421>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00342).

Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00342)

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

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

Compliance with principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

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

Статья поступила: 18.06.2023. **Принята к публикации:** 22.09.2023.

Article submitted: 18.06.2023. **Accepted for publication:** 22.09.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-137-148>

Транскриптомный анализ нейральных стволовых и прогениторных клеток в сравнении со стволовыми клетками глиобластомы

В.Е. Шевченко¹, Н.Е. Арноцкая¹, Т.И. Кушнир¹, А.С. Брюховецкий²

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

²Клинический госпиталь «НейроВита»; Россия, 121359 Москва, ул. Маршала Тимошенко, 7, стр. 1

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. В настоящее время отсутствует эффективная терапия глиобластомы. Отчасти это объясняется высокой степенью внутриопухолевой гетерогенности данной опухоли, источником которой, как полагают, являются стволовые клетки глиобластомы (СКГБ). Вопрос о происхождении СКГБ, имеющий большое значение для улучшения клинических результатов, пока остается открытым. Считается, что СКГБ могут образовываться в результате онкогенной трансформации нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК), имеющих схожие с ними морфологические и функциональные свойства. Несмотря на заметный прогресс в выяснении природы СКГБ, пока мало известно о специфически экспрессируемых генах и транскриптах в этих клетках по сравнению с НСПК. В связи с этим актуально изучение молекулярных механизмов глиоматоза с использованием модельных клеточных систем на основе различных клонов СКГБ (например, содержащих маркер CD133) в сравнении с НСПК.

Цель исследования – провести сравнительный транскриптомный анализ CD133⁺-НСПК и CD133⁺-СКГБ для определения молекулярно-генетических различий между фенотипами этих клеток и идентификации потенциальных мишеней для терапевтического воздействия на СКГБ.

Материалы и методы. Использовались высокочувствительный транскриптомный анализ на микрочипах высокой плотности, клеточные технологии и современный биоинформатический анализ.

Результаты. Транскриптомный анализ CD133⁺-СКГБ и CD133⁺-НСПК идентифицировал 1825 дифференциально экспрессированных генов. Установлены биологические процессы и сигнальные каскады, активированные в CD133⁺-СКГБ. Показано, что значительные транскриптомные aberrации в CD133⁺-СКГБ по сравнению с CD133⁺-НСПК прежде всего обусловлены группой транскриптов, регулируемых сигнальными каскадами SHH (Sonic Hedgehog), mTOR (mammalian target of rapamycin), ALK (anaplastic lymphoma kinase), факторами транскрипции E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*. Идентифицированы и аннотированы 6 транскриптов (AQP9, TOX15, HOXB2, STEAP3, TREM1, RFC2), высокоэкспрессированных в CD133⁺-СКГБ и тесно связанных с выживаемостью больных глиобластомой, которые могут являться потенциальными мишенями для терапевтического воздействия на CD133⁺-СКГБ.

Заключение. Полученные данные указывают на ряд значительных молекулярно-генетических различий между двумя фенотипами клеток, что может использоваться при разработке новых терапевтических подходов для лечения глиобластомы.

Ключевые слова: глиобластома, стволовые клетки глиобластомы, нейральные стволовые клетки, прогениторные клетки, транскриптомика

Для цитирования: Шевченко В.Е., Арноцкая Н.Е., Кушнир Т.И., Брюховецкий А.С. Транскриптомный анализ нейральных стволовых и прогениторных клеток в сравнении со стволовыми клетками глиобластомы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):137–48. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-137-148>

Transcriptomic analysis of neural stem and progenitor cells in comparison with glioblastoma stem cells

V.E. Shevchenko¹, N.E. Arnotskaya¹, T.I. Kushnir¹, A.S. Bryukhovetskiy²

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

²Clinical Hospital “NeuroVita”; Bld. 1, 7 Marshala Tymoshenko St., Moscow 121359, Russia

Contacts: Valery Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Introduction. There is currently no effective therapy for the treatment of glioblastoma. This is partly explained by the high degree of intra- and intertumor heterogeneity of GB, the source of which is believed to be glioblastoma stem cells (GSC). The question of the origin of GSC, which is important for improving clinical outcomes, still remains open. It is believed that GSCs can be formed as a result of oncogenic transformation of neural stem and progenitor cells (NSPCs), which have morphological and functional properties similar to them. Despite significant progress in elucidating the nature of GSCs, little is yet known about the specifically expressed genes and transcripts in these cells in comparison with NSPCs. In this regard, it becomes relevant to study the molecular mechanisms of gliomagenesis using model cell systems based on various clones of GSC.

Aim. To conduct a comparative transcriptomic analysis of CD133⁻-NSPCs and CD133⁺-GSCs to study the molecular genetic differences between the phenotypes of these cells and identify potential targets for therapeutic effects on GSCs.

Materials and methods. Used: highly sensitive transcriptomic analysis on high-density microarrays, cellular technologies, modern bioinformatics analysis.

Results. Transcriptomic analysis of CD133⁻-GSCs and CD133⁺-NSPCs identified 1825 differentially expressed genes. The biological processes and signaling cascades activated in CD133⁻-GSCs have been established. It was shown that significant transcriptomic aberrations in CD133⁻-GSC compared to CD133⁺-NSPC are primarily due to a group of transcripts regulated by the SHH (Sonic Hedgehog), mTOR (mammalian target of rapamycin), ALK (anaplastic lymphoma kinase) signaling cascades, transcription factors E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, as well as oncogenes *ERBB2* and *KRAS*. Six transcripts (AQP9, TOX15, HOXB2, STEAP3, TREM1, RFC2) highly expressed in CD133⁻-GSC and closely associated with the survival of patients with glioblastoma, which may be potential targets for therapeutic effects on CD133⁻-GSC associated with gliomagenesis, which may be potential targets for therapeutic effects on CD133⁻-GSC, have been identified and annotated.

Conclusion. The data obtained indicate a number of significant molecular genetic differences between the two cell phenotypes, which can be used in the development of new therapeutic approaches for the treatment of glioblastoma.

Keywords: glioblastoma, glioblastoma stem cells, neural stem cells, progenitor cells, transcriptomics

For citation: Shevchenko V.E., Arnotskaya N.E., Kushnir T.I., Bryukhovetskiy A.S. Transcriptomic analysis of neural stem and progenitor cells in comparison with glioblastoma stem cells. *Uspehi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):137–48. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-137-148>

ВВЕДЕНИЕ

Среди первичных опухолей головного мозга у взрослых глиобластома (ГБ) является наиболее распространенной и тяжелой формой заболевания. Средняя продолжительность жизни пациентов с данной патологией составляет 15 мес [1]. Стандартная терапия ГБ обеспечивает только ограниченный терапевтический эффект из-за быстроразвивающихся рецидивов [2]. Отчасти это объясняется высокой степенью внутриопухолевой гетерогенности, источником которой, как полагают, является небольшая субпопуляция стволовых клеток ГБ (СКГБ) [3]. Эти клетки устойчивы к облучению и генотоксической терапии и способны проникать в нормальную паренхиму головного мозга [2]. Стволовые клетки ГБ являются критически важными терапевтическими мишенями, так как их деление приводит к восстановлению опухоли и развитию рецидива после терапии [4].

Примечательно, что СКГБ морфологически похожи на нормальные нейральные стволовые клетки и их потомки — прогениторные клетки — и проявляют общие с ними функциональные свойства стволовости и мультипотентной дифференцировки [5]. Однако в отличие от нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) СКГБ теряют контроль над поддержанием баланса между этими двумя процессами [5]. Стволовые клетки ГБ также экспрессируют некоторые маркеры, ассоциированные с НСПК, включая CD133, CD24, EGFR и GFAP.

Считается, что СКГБ могут образовываться в результате онкогенной трансформации НСПК, которые

находятся в периваскулярных нишах головного мозга взрослого человека [6]. Неконтролируемая пролиферация внутри этих ограниченных нейрогенных областей приводит к созданию резервуара туморогенных клеток, образующих основную массу опухоли [7].

Недавние эксперименты показали, что СКГБ могут возникнуть из НСПК субвентрикулярной зоны, так как эти клетки в большей степени подвержены онкогенной трансформации по сравнению с НСПК гиппокампа или дифференцированными клетками [8]. Как и в случае многих солидных опухолей, ГБ имеет иерархическую организацию, отражающую нормальную систему стволовых клеток [7].

Согласно недавно полученным данным, СКГБ могут также возникать в результате репрограммирования нестволовых клеток ГБ (не-СКГБ), что приводит к фенотипической пластичности в популяции опухоли [9]. Например, показано, что эпигенетические модификации способны превратить не-СКГБ в СКГБ [10]. Концепция дедифференцировки не-СКГБ в СКГБ усложнила понимание гетерогенности ГБ, потенциального механизма терапевтического рецидива, резистентности к противоопухолевой терапии, а также вопросов, связанных с разработкой терапевтических стратегий. Таким образом, происхождение СКГБ остается неясным, что создает серьезную проблему в понимании нейробиологии ГБ. Дополнительные сложности связаны со способностью СКГБ модифицировать окружение опухоли, в том числе с помощью собственного пула внеклеточных частиц [11].

Предпринимались попытки систематизировать генетические aberrации в СКГБ и связанные с ними

нарушения сигнальных путей [12]. Однако это оказалось трудной задачей и не привело к обнаружению генов-драйверов и их транскриптов в редкой популяции СКГБ на фоне гетерогенной популяции опухолевых клеток. Идентификация генов и сигнальных путей, связанных с глиомагенезом, с использованием генетических и биохимических методов для больших популяций опухолевых клеток может привести к ошибочным выводам, поскольку будут получены только средние значения молекулярных сигнатур.

Несмотря на заметный прогресс в выяснении природы СКГБ, пока мало известно о специфически экспрессируемых генах и транскриптах в этих клетках по сравнению с НСПК. В связи с этим актуальным становится изучение молекулярных механизмов глиомагенеза с использованием модельных клеточных систем на основе различных клонов СКГБ (например, содержащих маркер CD133), в сравнении с НСПК.

В настоящем исследовании впервые использована экспериментальная модельная система для изучения молекулярно-генетических различий между СКГБ и НСПК. В качестве линий клеток применяли CD133⁺-СКГБ (далее – СКГБ), полученные из глиомасфер культуры иммортализованных клеток U87MG ГБ человека, и CD133⁺-НСПК (далее – НСПК), выделенные из нейросфер культуры клеток обонятельной выстилки верхнего носового хода человека. Сравнительный транскриптомный анализ СКГБ и НСПК идентифицировал 1825 дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ). В результате биоинформатического анализа установлены биологические процессы и сигнальные каскады, активированные в СКГБ. Показано, что значительные транскриптомные aberrации в СКГБ по сравнению с НСПК прежде всего связаны с действием групп генов, экспрессия которых регулируется сигнальными каскадами SHH (Sonic Hedgehog), mTOR (mammalian target of rapamycin), ALK (anaplastic lymphoma kinase), факторами транскрипции E2F1, PRC2, NOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*. Идентифицированы и аннотированы 6 транскриптов (AQP9, TOX15, NOXB2, STEAP3, TREM1, RFC2), высокоэкспрессированных в CD133⁺-СКГБ и тесно связанных с выживаемостью больных ГБ, которые могут являться потенциальными мишенями для терапевтического воздействия на CD133⁺-СКГБ.

Подтверждена целесообразность использования культур СКГБ и НСПК в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов глиомагенеза. Результаты исследования указывают на ряд значительных молекулярно-генетических различий между двумя фенотипами клеток, что может использоваться при разработке новых подходов для лечения ГБ.

Цель исследования – изучить молекулярно-генетические различия между СКГБ и НСПК человека и идентифицировать потенциальные мишени для терапевтического воздействия на СКГБ на экспери-

ментальной клеточной модели с использованием высокопроизводительного транскриптомного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия CD133⁺-СКГБ. Эту клеточную линию получали из глиомасфер культуры иммортализованных клеток U87 MG ГБ человека методом, описанным ранее [13]. Клетки ГБ U87 культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Gibco, Life Technologies, Россия) в 10 % фосфатном буферном растворе при 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Прикрепившиеся клетки культивировали до 80 % конfluence и пассировали из расчета 1: 3. Клетки U87 MG ресуспендировали в среде для образования нейросфер: DMEM/F12 (Sigma Aldrich, США); L-глутамин (2 mM, Life Technologies, Россия); B27 (Life Technologies, Россия); фактор роста фибробластов (bFGF) (20 нг/мл, Sigma Aldrich, США); эпидермальный фактор роста (EGF) (20 нг/мл, Sigma Aldrich, США); пенициллин/стрептомицин (100 ед/мл); гепарин (5 мкг/мл). Культивирование проводили во флаконах T75, при 37 °C, в атмосфере 5 % CO₂. Добавление свежих ростовых факторов проводили через 3 сут. Прикрепившиеся клетки культивировали до достижения 80 % конfluence, затем пассировали из расчета 1: 3. При достижении достаточного общего количества клеток проводили селекцию CD133⁺-клеток методом иммуносортинга с использованием магнитных шариков с иммобилизованными на них антителами к CD133 (Miltenyi Biotec, Германия). После этого культивировали CD133⁺-клетки в той же среде (3 пассажа). Чистоту культуры оценивали с помощью проточной цитометрии с антителами к CD133 (5–10 мкг/мл; Miltenyi Biotec, Германия); она превышала 90 % [13].

Клеточная линия CD133⁺-НСПК. После получения письменного информированного согласия пациента (мужчина, 42 лет, находящийся в Клиническом госпитале «НейроВита», Москва) эндоскопически забирали фрагмент обонятельной выстилки из верхнего носового хода (размерами 1 × 1 см). CD133⁺-НСПК выделяли из нейросфер культуры клеток эксплантированного фрагмента обонятельного эпителия по методике, описанной ранее [14]. Для получения НСПК фрагмент ткани обонятельного эпителия носа человека инкубировали с раствором коллагеназы (2 мг/мл) в течение 10 мин при 37 °C для полной диссоциации эпителия на отдельные клетки. Полученные клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (1: 1), содержащей 10 % фосфатного буферного раствора, 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина и 60 мкг/мл гентамицина. Первичная культура клеток человека образовывала конfluence монослой в течение 5–7 сут. Для получения нейросфер клетки обонятельного эпителия пассировали на пластик, покрытый 0,01 % поли-L-лизинном, и культивировали

в бессывороточной среде DMEM/F-12 (1: 1), содержащей 2 мМ L-глутамин, 1 % добавки инсулина, трансферрина, селенита натрия (ITS), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, EGF и bFGF. Клетки цитосфер характеризовали по экспрессии нестина (Miltenyi Biotec, Германия), Thy1, CD90 (Miltenyi Biotec, Германия), NF200 (Sigma Aldrich, США) и GFAP (концентрация 1 мкг/мл, поликлональный, Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Россия) с помощью иммуноцитохимического анализа [13]. CD133⁺-НСПК выделяли методом иммуносортинга, описанным выше.

Транскриптомный анализ. Тотальную РНК выделяли из лизатов 5×10^6 клеток после предварительной гомогенизации с помощью QIAshredder и очистки с применением набора реактивов RNeasy Mini Kit (Qiagen, Голландия) согласно протоколу производителя. Анализ количества и качества тотальной РНК проводили с помощью Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, США) и набора реактивов Agilent RNA Pico 6000 Kit (Agilent, США). Значение интегрального показателя сохранности РНК (RIN – RNA Integrity Number) более 8,0 принимали за пороговое значение для перехода к этапу подготовки библиотеки. Процессирование, амплификацию, мечение и гибридизацию образцов проводили в соответствии с протоколом набора реагентов GeneChip WT PLUS, а затем гибридизовали с GeneChip Human Gene 2.0 ST (Affymetrix, США) в печи для гибридизации GeneChip 640. Промывку и сканирование проводили с использованием набора Expression Wash, Stain and Scan Kit и системы GeneChip (Affymetrix, США) (станция GeneChip Fluidics 450 и сканер GeneChip 3000-7G) с программным обеспечением Affymetrix GCOS. Сгенерированные файлы CEL использовались для дальнейшей статистической обработки с помощью программы Affymetrix® Data Mining Tool 3.0 (Affymetrix, США).

Биоинформатический анализ. Анализ обогащения генов, использующий онтологию генов (GO, Gene Ontology; <http://geneontology.org/>) и базу сигнальных путей KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes; <http://www.kegg.jp/>), проводили с использованием программы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov/>), а также открытой базы данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Для идентификации сигнальных путей, дифференциально активируемых между СКГБ и НСПК, провели анализ обогащения набора генов с использованием программного пакета GSEA v. 4.3.2 (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). Информацию по экспрессии матричной РНК (мРНК) в опухолевой и нормальной тканях получали из базы «Атлас генома рака» (The Cancer Genome Atlas, TCGA). Корреляцию между экспрессией генов и их клинической значимостью выполнили с помощью программы UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения биологических процессов и сигнальных путей, отличающих СКГБ от НСПК, проводили сравнительный транскриптомный анализ лизатов 2 типов клеток (в триплетах). После обработки данных по уровням мРНК получен профиль экспрессии генов в СКГБ и НСПК. В результате идентифицированы 22 148 генов. Статистически значимые изменения экспрессии ($p < 0,05$) с кратностью > 2 или $< 0,5$ имели 1825 генов, относящихся к ДЭГ. В СКГБ экспрессия 938 ДЭГ была выше, а экспрессия 887 ДЭГ – ниже по сравнению с НСПК. Транскрипты типичных маркеров НСПК (ASCL1, CD133, CD15, CD24, DCX, DLX2, EGFR, GSX2, GFAP, KIF4, LGALS3, NES, THBS, THY1) присутствовали в обеих популяциях клеток, однако экспрессия некоторых из них значительно различалась. Так, уровни мРНК CD24 в НСПК были в 2,2 раза ниже, а THY1 в 87,9 раза выше по сравнению с СКГБ. Согласно полученным результатам и данным TCGA, из 938 ДЭГ, положительно регулируемых в СКГБ, 66 имели экспрессию более чем на порядок выше, чем в НСПК, и включали (по данным TCGA) 18 прогностических генов для ГБ (*AQP9, SPP1, PNLIPRP3, IL1F8, TM4SF19, ATP6V0D2, VAT1L, SBSN, MCTP1, IL31RA, CA9, VSNL1, PCSK1, PTPRN, AHNAK2, LINGO2, TBX15, ENO2*). Из 887 ДЭГ, отрицательно регулируемых в СКГБ, 12 имели экспрессию более чем на порядок ниже, чем в НСПК (*PNPLA4, FAM43A, FBLN2, ANO4, CPXM2, SLIT2, PRICKLE1, TNFRSF11B, IGFBP5, LOC554202, ACTG2, THY1*), и относились к прогностическим генам для ГБ.

Для ассоциации набора генов с изменением фенотипа клеток использовали несколько методов, включая анализ обогащения генов на основе базы данных предварительно аннотированных наборов генов в терминах онтологии генов (GO) и сигнальных путей KEGG, а также разработанный сравнительно недавно метод GSEA. Первые 2 метода подтвердили, что 1825 ДЭГ обогащены в сигнальных каскадах RAP1, PI3K-Akt, p53, MAPK, а также связанных с адгезией, клеточным циклом, апоптозом, протеогликанами и обменом кальция. Интересно, что из 73 ДЭГ, кодирующих белки онкогенных сигнальных каскадов, 21 ген имел в СКГБ повышенную экспрессию, а 52 – пониженную по сравнению с НСПК.

Данные по всем генам проанализировали с помощью программы GSEA, учитывающей функциональные связи генов между собой. В некоторых случаях, например, при слабом изменении индивидуальной экспрессии отдельных генов, применение GSEA приводит к повышению чувствительности метода и получению более полной картины дифференциальной

Таблица 1. Биологические процессы и сигнальные пути для наиболее обогащенных дифференциально экспрессированных генов

Table 1. Biological processes and signaling pathway for the most enriched differentially expressed genes

| Биологический процесс Biological process | Количество генов Quantity of genes | <i>p</i> | Сигнальный путь Signal pathway | Количество генов Quantity of genes | <i>p</i> |
|---|---------------------------------------|----------|--|---------------------------------------|----------|
| Клеточная адгезия Cell adhesion | 92 | 4,4E-12 | Молекулы клеточной адгезии Cell adhesion molecules | 34 | 3,8E-6 |
| Миграция клеток Cell migration | 53 | 7,8E-10 | Онкогенные сигнальные каскады Pathways in cancer | 73 | 3,4E-4 |
| Передача сигнала Signal transduction | 149 | 1,4E-7 | Сигнальный каскад Rap1 Rap1 signaling pathway | 35 | 6,6E-4 |
| Репликация ДНК DNA replication | 26 | 3,7E-6 | Сигнальный каскад PI3K-Akt PI3K-Akt signaling pathway | 49 | 3,3E-3 |
| Апоптотический процесс Apoptotic process | 78 | 1,0E-5 | Клеточный цикл Cell cycle | 26 | 4,1E-3 |
| Реакция на гипоксию Response to hypoxia | 30 | 1,1E-5 | TSP-1-индуцированный апоптоз микрососудистых эндотелиальных клеток TSP-1 Induced apoptosis in microvascular endothelial cell | 5 | 5,3E-3 |
| Ангиогенез Angiogenesis | 39 | 5,0E-5 | Протеогликины при раке Proteoglycans in cancer | 31 | 6,3E-3 |
| Деление клеток Cell division | 52 | 7,2E-5 | Сигнальный каскад p53 p53 signaling pathway | 15 | 6,4E-3 |
| Воспалительная реакция Inflammatory response | 56 | 8,8E-5 | Сигнальный путь фактора некроза опухоли Tumor necrosis factor signaling pathway | 20 | 7,1E-3 |
| Внутриклеточная передача сигнала Intracellular signal transduction | 59 | 9,2E-5 | Сигнальный каскад кальция Calcium signaling pathway | 36 | 8,2E-3 |
| Клеточный хемотаксис Cell chemotaxis | 17 | 1,6E-4 | Сигнальный путь MAPK MAPK signaling pathway | 41 | 1,0E-2 |

экспрессии [15]. Для поиска набора генов, коррелирующих с фенотипом СКГБ, при анализе матрицы экспрессии генов СКГБ и НСПК применяли базу онкогенных данных C6. all. v2023.1.Hs.symbols.gvt из молекулярных подписей MsigDB (The Molecular Signatures Database) при ложном уровне обнаружения (false discovery rate, FDR) <0,30.

Основным результатом анализа обогащения набора генов с помощью этого метода является нормализованный показатель обогащения (normalized enrichment score, NES), отражающий степень представленности функциональных групп генов вверху или внизу их ранжированного списка. Величина прироста зависит от корреляции гена с фенотипом. Положительный NES указывает на обогащение набора генов в верхней части ранжированного списка, отрицательный NES – внизу ранжированного списка. Величина номинального значения *p* (nominal *p*-value, NOM *p*) определяет статистическую значимость показателя обогащения [16].

С помощью программы GSEA было установлено, что из 187 обогащенных наборов генов 56 имеют повышенную экспрессию в СКГБ по сравнению с НСПК. В табл. 2 представлены 11 наиболее значимых коэкспрессированных серий генов (NES = 1,63–1,40; NOM *p* <0,015; FDR <10 %), которые активно участвуют в онкогенезе и связаны с фенотипом СКГБ. Согласно данным, представленным в табл. 2, 1-е место в ранжированном списке занимает набор генов, регулируемых сигнальным каскадом SHH, ниже располагаются серии, связанные с E2F1-мишенью, кластеры генов, транскрипция которых контролируется транскрипционными факторами PRC2, HOXA9 и MYC, группы генов, регулируемых онкогенами *ERBB2* и *KRAS*.

В результате GSEA-анализа получены графики обогащения, частично представленные на рисунке, которые графически представляют показатель обогащения конкретного набора генов. Верхняя часть графика демонстрирует текущий показатель обогащения

Таблица 2. Анализ GSEA 11 наиболее обогащенных серий генов, имеющих повышенную экспрессию в стволовых клетках глиобластомы по сравнению с нейральными стволовыми и прогениторными клетками

Table 2. GSEA analysis of the 11 most enriched series of genes that have increased expression in glioblastoma stem cells compared to neural stem and progenitor cells

| Серия генов Gene series | Количество генов Quantity of genes | NES | NOM <i>p</i> | FDR <i>q</i> |
|----------------------------|---------------------------------------|------|--------------|--------------|
| GCNP_SHH_UP_EARLY.V1_UP | 160 | 1,63 | 0 | 0,038 |
| E2F1_UP.V1_UP | 171 | 1,62 | 0 | 0,021 |
| PRC2_EED_DN.V1_DN | 177 | 1,61 | 0 | 0,017 |
| HOXA9_DN.V1_DN | 168 | 1,52 | 0 | 0,042 |
| RPS14_DN.V1_DN | 174 | 1,51 | 0 | 0,038 |
| CSR_LATE_UP.V1_UP | 155 | 1,48 | 0,0040 | 0,044 |
| MYC_UP.V1_UP | 157 | 1,48 | 0,0038 | 0,042 |
| MTOR_UP.N4.V1_UP | 181 | 1,45 | 0,0019 | 0,049 |
| ERBB2_UP.V1_DN | 177 | 1,42 | 0,0019 | 0,066 |
| KRAS.KIDNEY_UP.V1_UP | 136 | 1,41 | 0,0056 | 0,064 |
| ALK_DN.V1_UP | 133 | 1,40 | 0,0139 | 0,065 |

Примечание. NES – normalized enrichment score, нормализованный показатель обогащения набора генов; NOM *p* – nominal *p*-value, номинальное значение *p* (статистическая значимость показателя обогащения); FDR *q* – false discovery rate *q*-value, уровень ложноположительных результатов для нормализованного показателя обогащения.

Note. NES – normalized enrichment score; NOM *p* – nominal *p*-value (statistical significance of the enrichment score); FDR *q* – false discovery rate *q*-value.

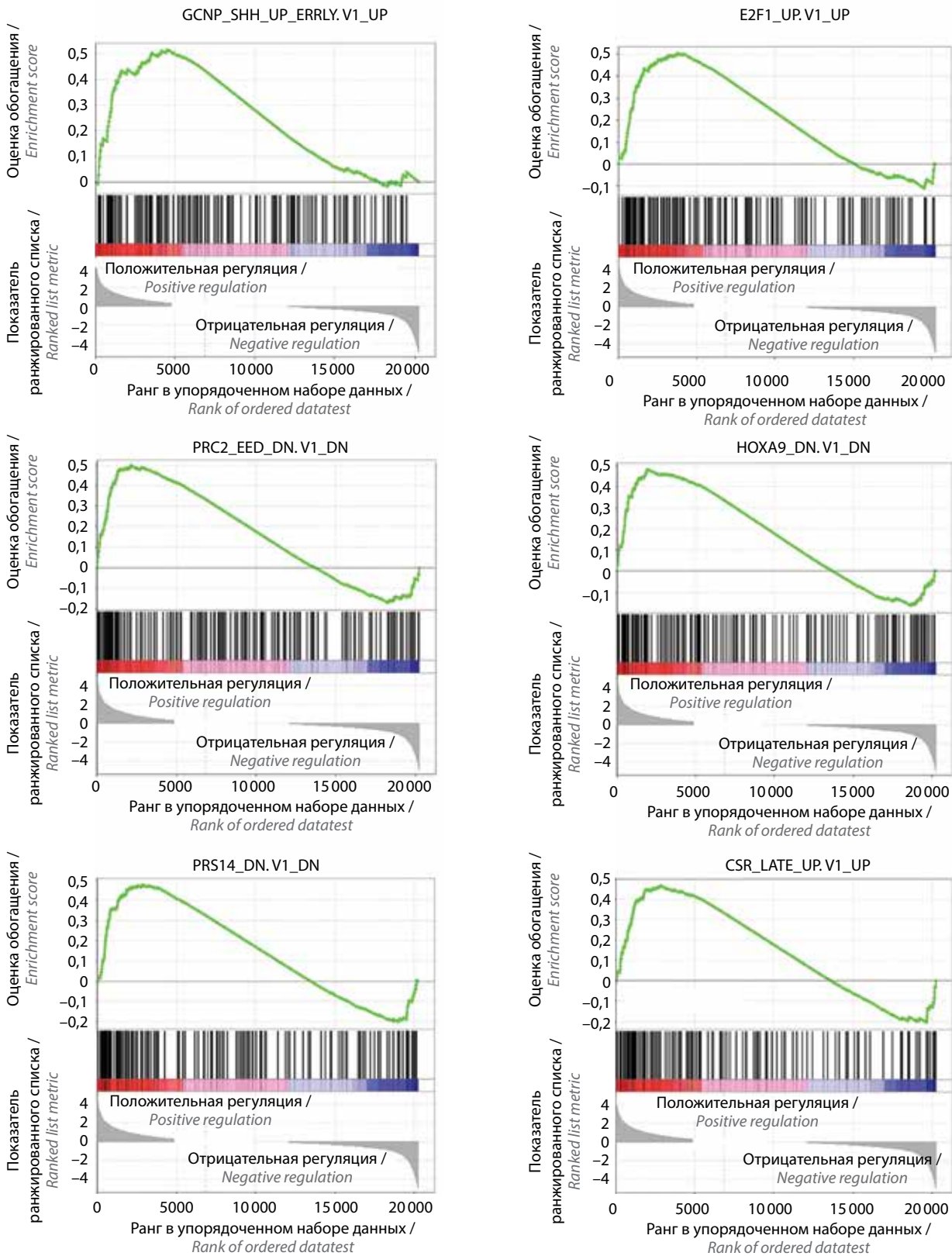
(ES) для серии генов по мере продвижения анализа по ранжированному списку. Значение на пике графика представляет собой ES для данной серии генов. Наборы генов с пиком в начале или в конце ранжированного списка обычно представляют наибольший интерес. Согласно данным, представленным на рисунке, для 6 серий генов наблюдался отчетливый более высокий максимум в начале графика, что указывает на положительную регуляцию обогащенной группы генов в СКГБ по сравнению с НСПК. Аналогичные результаты были получены для всех 11 наборов генов. Передовое подмножество генов вносит наибольший вклад в ES. Для положительного ES (как в нашем случае) переднее подмножество – это набор ДЭГ, которые положительно регулируются в СКГБ по сравнению с НСПК.

Веб-портал UALCAN провалидировал мРНК для ДЭГ, используя данные проекта TCGA. Анализ показал, что из 938 положительно регулируемых транскриптов для ДЭГ в СКГБ 85 мРНК рассматривались в TCGA как перспективные прогностические маркеры ГБ, тесно связанные с клиническими показателями. При формировании панели транскриптов, которые могут служить потенциальными мишенями для таргетирования СКГБ, принимали во внимание их уровни экспрессии в 2 популяциях клеток, параметры кривых общей выживаемости Каплана–Мейера для больных ГБ, а также экспрессию мРНК в нормальной и опухолевой тканях. В результате были отобраны перспек-

тивные транскрипты-мишени для терапевтического воздействия на СКГБ, данные по которым представлены в табл. 3. Все мРНК таргетных генов в СКГБ имели повышенную экспрессию и довольно низкие значения Logrank *p* для графиков общей выживаемости Каплана–Мейера.

ОБСУЖДЕНИЕ

Все больше данных свидетельствует о том, что СКГБ ответственны за инициацию опухоли, развитие лекарственной устойчивости и рецидива ГБ [17]. К сожалению, нет единого мнения относительно маркеров этих клеток. Источником опухоли могут быть нейральные стволовые клетки, перерожденные в СКГБ, или их потомки – прогениторные клетки, потерявшие правильный вектор миграции в зону «созревания» и осевшие в случайном месте мозговой ткани [18]. Эти 2 модели не исключают друг друга, а указывают на 2 независимых пути вариабельности, которые могут развиваться одновременно и вносить свой вклад в разнообразие клеток ГБ [18]. Многие исследователи считают, что определенные клоны СКГБ возникают в результате трансформации пула НСПК [19]. Основанием для этого служит наличие у них общих черт с НСПК, таких как экспрессия множества идентичных клеточных маркеров, самообновление и способность к мультидифференцировке [20]. Однако в отличие от НСПК СКГБ содержат обширные генетические аномалии, характерные для заболевания,



Графики обогащения 6 положительно регулируемых наборов генов для фенотипа стволовых клеток глиобластомы, полученные с помощью программы GSEA

Enrichment plots of 6 up-regulated gene sets for the glioblastoma stem cells phenotype obtained by GSEA program

и образуют опухоли, повторяющие ГБ человека при введении их в области мозга мыши, соответствующие местам возникновения данной опухоли у пациентов.

Несмотря на достигнутый прогресс в изучении СКГБ, молекулярные механизмы неопластической трансформации НСПК в СКГБ пока до конца не изучены.

Таблица 3. Потенциальный набор транскриптов для таргетирования стволовых клеток глиобластомы, включая отношение экспрессии дифференциально экспрессированных транскриптов стволовых клеток глиобластомы (СКГБ) и нейральных стволовых и прогениторных клеток (НСПК) ($p < 0,05$)

Table 3. Potential set of transcripts for targeting glioblastoma stem cells, including the expression ratio of differentially expressed transcripts of glioblastoma stem cells (GSC) and neural stem and progenitor cells (NSPC) ($p < 0.05$)

| Матричная РНК Matrix RNA | Кодируемый белок Encoded protein | СКГБ/НСПК GSC/NSPC | Log-rank p |
|-----------------------------|--|-----------------------|--------------|
| AQP9 | Акваторин 9 Aquaporin 9 | 93,60 | 0,057 |
| TBX15 | T-бокс фактора транскрипции 15 T-box transcription factor 15 | 10,91 | 0,038 |
| HOXB2 | Гомеобокс B2 Homeobox B2 | 6,09 | 0,00076 |
| STEAP3 | Металлоредуктаза STEAP3 STEAP3 metalloredutase | 3,54 | 0,020 |
| TREM1 | Триггерный рецептор 1, экспрессируемый на миелоидных клетках Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 | 2,72 | 0,033 |
| RFC2 | Фактор репликации C2 Replication factor C2 | 2,03 | 0,0037 |

Примечание. Log-rank p – значение p для лонгрангового критерия.

Note. Log-rank p – p -value for long-rank test.

Считается, что СКГБ могут появляться в результате множественных генетических и эпигенетических изменений, влияющих на внутриклеточные сигнальные пути, что приводит к трансформации клеток НСПК [20].

В этом исследовании мы сравнили паттерны экспрессии генов СКГБ и НСПК для обнаружения транскрипционных аномалий, которые могут лежать в основе глиоматоза. Чтобы изучить изменения уровней мРНК в 2 популяциях клеток, мы провели сравнительный транскриптомный анализ на микрочипах с использованием модельной системы на основе клеточных линий CD133⁺-СКГБ и CD133⁺-НСПК. Маркер клеточной поверхности CD133 одинаково экспрессируется в СКГБ и НСПК и был использован для отбора субклонов этих клеток и повышения достоверности полученных результатов.

В отличие от многочисленных транскриптомных исследований ГБ [21], которые в основном были проведены на биопсийном материале пациентов и имели ограничения, связанные с клеточной гетерогенностью, наши данные впервые получены с использованием модельной клеточной системы, содержащей CD133-положительные СКГБ и НСПК. Объединив высокочувствительный транскриптомный анализ с модельной системой СКГБ – НСПК, мы разделили популяцию злокачественных и нормальных клеток и тем самым повысили надежность полученных результатов.

Биоинформатический анализ данных проводили в несколько этапов. Сначала идентифицированы 1825 мРНК ДЭГ, которые указывали на значительные транскрипционные аномалии в СКГБ. Так, экспрес-

сия 170 мРНК изменялась более чем на порядок в СКГБ по сравнению с НСПК. Для изучения набора генов, связанного с изменением фенотипа клеток, использовали несколько биоинформатических методов, включая анализ обогащения генов в терминах GO и сигнальных путей KEGG, а также GSEA.

Результат использования первых двух методов для ДЭГ (см. табл. 1) демонстрирует обогащение многих биологических процессов и сигнальных путей в СКГБ, связанных с онкогенезом. Несмотря на широкое применение, анализы в терминах GO и KEGG представляют обогащение отдельных генов, не учитывая связь между ними и уровни их экспрессии. Данные методы могут пропускать некоторые важные гены, которые не демонстрируют существенную разницу между фенотипами. Поэтому все полученные транскрипты подвергли дальнейшему анализу с помощью программы GSEA – другого мощного аналитического метода (см. табл. 2).

С помощью анализа GSEA ранжированы обогащенные группы генов, которые положительно регулируются в СКГБ по сравнению с НСПК и расположены в порядке значимости для фенотипа СКГБ. Согласно данным, представленным в табл. 2, на 1-м месте находится кластер генов GCNP_SHN_UP_EARLY_V1_UP, что подчеркивает его важность для СКГБ. В составе этой серии – 58 положительно экспрессируемых генов, активность которых контролируется сигнальным каскадом SHN. Ранее показана большая роль SHN в регулировании стволовости, самообновления СКГБ и их резистентности к противоопухолевой

терапии [22]. Таргетирование сигнального каскада SHH представляет значительный интерес для разработки новых видов терапии глиобластомы.

На 2-м месте находится серия генов E2F1_UP. V1_UP, синтез мРНК которых положительно регулируется транскрипционным фактором E2F1. Этот белок тесно связан с клеточным циклом, модулирует переход клеток из фазы покоя к синтезу ДНК, играет большую роль в апоптозе и трансдукции сигналов. Активация каскада E2F1 усиливает пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиомы [23].

Третье место занимает серия генов PRC2_EED_DN. V1_DN, включающая 26 % таргетных генов, транскрипция которых контролируется PRC2 (Polycomb repressive complex 2) – членом группы Polycomb, представляющей собой важное семейство регуляторов транскрипции. Репрессивный комплекс Polycomb 2, отвечающий за триметилирование H3K27, играет большую роль в онкогенезе и считается перспективной терапевтической мишенью для эпигенетической терапии рака [24].

Согласно данным, представленным в табл. 2, группа генов HOXA9_DN. V1_DN по значимости для фенотипа СКГБ находится на 4-м месте и включает 46 положительно регулируемых генов, синтез мРНК которых контролируется фактором транскрипции HOXA9 (Homeobox A9). Семейство HOX регулирует активность клеток, облегчая передачу внутриклеточных сигналов. Доказано важное значение HOXA9 в прогрессировании солидных опухолей [25], а его aberrantная экспрессия тесно связана с прогнозом для пациентов с ГБ [26].

В серию RPS14_DN. V1_DN входят гены, транскрипты которых контролируются рибосомальным протеином RPS14, высокоэкспрессированным в глиоме [27]. Снижение его экспрессии приводит к подавлению пролиферации, миграции клеток глиомы и вызывает апоптоз клеток в опытах *in vitro*, а в опытах *in vivo* ингибирует рост опухоли [28].

Транскрипты группы генов CSR_LATE_UP. V1_UP активно взаимодействуют с белком CSR (cellular stress response), структурно подобным рецептору для улавливания макрофагов. Этот белок является мощным регулятором внутриклеточных активных форм кислорода (АФК). В условиях окислительного стресса АФК значительно истощены в клетках со сверхэкспрессией CSR, который защищает клетки, удаляя АФК или побочные продукты окисления [29].

Серия генов MYC_UP. V1_UP содержит 30 % таргетных генов для фенотипа СКГБ, транскрипция которых положительно регулируется семейством факторов транскрипции MYC. Нами получены данные об увеличении уровней мРНК для ДЭГ этой группы, включая *TMEFF2*, *ITPR1*, *CDC47L*, *JPH1*, *CHKA*. Белок Myc связан с большинством опухолей человека и высоко экспрессируется в опухолевой ткани больных ГБ [30]. Ингибирование MYC снижает пролиферацию,

увеличивает апоптоз и, что примечательно, вызывает образование многоядерных клеток, которые затем погибают в результате митотической катастрофы [30]. Также этот белок участвует в регуляции пролиферации и выживаемости СКГБ [31].

Транскрипты серии генов MTOR_UP. N4. V1_UP активно взаимодействуют с семейством киназ mTOR. Эти киназы опосредуют клеточные реакции на стрессы, такие как повреждение ДНК и недостаток питательных веществ. Сигнальный каскад mTOR активирован при ГБ и является ключевым в биологии этой опухоли, способствует самообновлению, пролиферации и инфильтрации СКГБ [32]. Таргетирование mTOR может быть многообещающим подходом к профилактике и лечению ГБ.

Кластер генов ERBB2_UP. V1_DN тесно связан с онкогеном *ERBB2*. Сообщалось об амплификации и/или повышенной экспрессии этого гена при многих видах рака, включая ГБ. Кроме того, анализ иммунных генов и сигнатур, связанных с *ERBB2*, показал его значительную роль в опосредовании иммунного ответа на опухолевых клетках при глиоме [33].

Гены группы KRAS. KIDNEY_UP. V1_UP контролируются онкогеном *KRAS*. Активированный онкоген *KRAS* трансформирует нормальные прогениторные клетки в СКГБ, которые показывают нетипичную морфологию и формируют агрессивные опухоли у ксенографтов [34]. На молекулярном уровне возникали метаболические профили и профили экспрессии генов, связанные с неоплазией. Более того, активация *KRAS* приводила к значительной пролиферации опухолевых клеток [34].

Транскрипты серии генов ALK_DN. V1_UP тесно взаимодействуют с ALK (anaplastic lymphoma kinase) и ее лигандом – плейотрофином, необходимыми для самообновления и туморогенности СКГБ. Кроме того, плейотропин трансактивируется непосредственно SOX2, необходимым для поддержания как нейральных стволовых клеток, так и СКГБ. Ось плейотрофин – ALK может быть многообещающей мишенью для терапии ГБ [35].

Согласно полученным результатам можно сделать вывод о том, что значительные aberrации экспрессий транскриптов в СКГБ по сравнению с НСПК прежде всего связаны с действием групп генов, экспрессия которых регулируется сигнальными каскадами SHH, mTOR, ALK, факторами транскрипции E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*, что согласуется с данными других авторов [21].

На следующем этапе исследования мРНК для ДЭГ были провалидированы с учетом их связи с клинико-патологическими характеристиками больных ГБ с использованием базы TCGA. В табл. 3 представлены кандидатные транскрипты, которые могут быть мишенями для терапевтического воздействия на СКГБ. Для их идентификации использовали следующие критерии:

- 1) экспрессия мРНК должна быть выше в СКГ по сравнению с НСПК;
- 2) необходимо, чтобы наблюдалось статистически достоверное повышение экспрессии транскрипта в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью;
- 3) кривые общей выживаемости Каплана–Мейера для пациентов с высоким и низким уровнями транскриптов должны достоверно различаться.

Согласно данным, представленным в табл. 3, этим критериям удовлетворяли 6 мРНК, краткая характеристика которых представлена ниже.

Ген *AQP9* кодирует член семейства аквапоринов (AQP) – водоселективных мембранных каналов. Этот ген тесно связан с регуляцией объема клеток, участвует в патогенезе ГБ, способствует подвижности, инвазивности, образованию отеков и облегчает метаболизм в опухолевых клетках в условиях гипоксии [36]. В литературе описан ряд ингибиторов аквапоринов, включая аналоги сульфаниламидов, TGN-020 и противоэпилептические препараты [37].

Ген *TBX15* принадлежит к семейству генов Т-бокс. Фактор транскрипции *TBX15* активируется в различных опухолях и способствует неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток, помогая избежать апоптоз [38]. Экспрессия *TBX15* увеличена в глиомах человека и ассоциируется с ухудшением выживаемости пациентов с данной патологией. Кроме того, повышенная экспрессия *TBX15* связана с генами, участвующими в иммуносупрессии при глиоме [38].

Матричная РНК *HOXB2* кодирует фактор транскрипции, аномальная экспрессия которого связана с различными опухолевыми процессами. Высокая экспрессия *HOXB2* ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с ГБ и коррелирует с их возрастом. Подавление экспрессии *HOXB2* замедляет рост, инвазию и миграцию опухолевых клеток [39]. Этот ген также играет большую роль в регуляции иммунной реакции на клетки глиомы низкой степени злокачественности [40].

Продукт гена *STEAP3* активно участвует в глиоматогенезе. Высокий уровень его экспрессии ассоциируется с негативным прогнозом у пациентов с глиомами дикого типа IDH1/2 [41, 42]. Снижение экспрессии *STEAP3* уменьшает пролиферацию клеток, инвазию, образование сфер *in vitro* и рост опухоли *in vivo* [42].

Ген *TREM1* кодирует рецептор, играющий ключевую роль в воспалительных и иммунных процессах,

происходящих в микроокружении опухоли, в частности ГБ [43]. Повышенная экспрессия этого гена наблюдается в ГБ всех молекулярных подтипов и связана с плохим прогнозом [44]. Полагают, что высокая экспрессия *TREM1* обусловлена в основном проникновением в опухоль миелоидных иммунных клеток [43]. В настоящее время проходят предклинические испытания ряда пептидных ингибиторов *TREM1*, включая LR12, CF9 и др. [45].

Ген *RFC2* активно экспрессируется на уровне как мРНК, так и белка в различных типах опухолевой ткани, в том числе в ткани глиом низкой степени злокачественности. Его повышенная экспрессия коррелирует с клиническими характеристиками пациентов с данной патологией и может служить индикатором неблагоприятного прогноза [46]. Ингибирование *RFC2* снижает пролиферацию клеток глиом низкой степени злокачественности и способствует их апоптозу [46]. Терапевтическим действием при ГБ обладает ксантогумол – природный пренилированный флавоноид, выделенный из *Humulus lupulus L.* (хмеля); он ингибирует экспрессию *RFC2* [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Транскриптомный анализ модельной системы на основе CD133⁺-СКГБ и CD133⁺-НСПК может успешно использоваться для изучения природы СКГБ, поиска паттерна генов, подтверждающих общие признаки и отмечающих различия 2 фенотипов этих клеток. В ходе транскриптомного анализа СКГБ и НСПК идентифицированы 1825 ДЭГ. В результате использования современных биоинформатических методов установлены биологические процессы и сигнальные каскады, активированные в СКГБ. Показано, что значительные транскриптомные aberrации в СКГБ по сравнению с НСПК прежде всего обусловлены группами транскриптов, регулируемых сигнальными каскадами SHN, mTOR, ALK, факторами транскрипции E2F1, PRC2, HOXA9, MYC, а также онкогенами *ERBB2* и *KRAS*. Идентифицированы и аннотированы 6 транскриптов (*AQP9*, *TOX15*, *HOXB2*, *STEAP3*, *TREM1*, *RFC2*), связанных с глиоматогенезом, которые могут использоваться для таргетирования СКГБ.

Обнаруженные в ходе исследования значительные молекулярно-генетические различия между СКГБ и НСПК могут использоваться при разработке терапии, направленной против СКГБ.

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

- Huse J.T., Holland E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 2010;10(5):319–31. DOI: 10.1038/nrc2818
- Chinnaiyan P., Won M., Wen P.Y. et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro Oncol* 2018;20(5):666–73. DOI: 10.1093/neuonc/nox209
- Roos A., Ding Z., Loftus J.C. et al. Molecular and microenvironmental determinants of glioma stem-like cell survival and invasion. *Front Oncol* 2017;7:120. DOI: 10.3389/fonc.2017.00120
- Chen J., McKay R.M., Parada L.F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models and stem cells. *Cell* 2012;149(1):36–47. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.009
- Corsaro A., Bajetto A., Thellung S. et al. Cellular prion protein controls stem cell-like properties of human glioblastoma tumor-initiating cells. *Oncotarget* 2016;7(25):38638–57. DOI: 10.18632/oncotarget.9575
- Basak O., Taylor V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1057–72. DOI: 10.1007/s00018-008-8544-x
- Ryskalin L., Gaglione A., Limanaqi F. et al. The autophagy status of cancer stem cells in glioblastoma multiforme: from cancer promotion to therapeutic strategies. *Int J Mol Sci* 2019;20(15):3824. DOI: 10.3390/ijms20153824
- Loras A., Gonzalez-Bonet L.G., Gutierrez-Arroyo J.L. et al. Neural stem cells as potential glioblastoma cells of origin. *Life* 2023;13(4):905. DOI: 10.3390/life13040905
- Friedmann-Morvinski D. Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* 2014;19(5):327–36. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2014011777
- Natsume A., Ito M., Katsushima K. et al. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res* 2013;73(14):4559–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0109
- Broekman M.L., Maas S.L.N., Abels E.R. et al. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol* 2018;14(8):482–95. DOI: 10.1038/s41582-018-0025-8
- McLendon R., Friedman A., Bigner D. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455(7216):1061–8. DOI: 10.1038/nature07385
- Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissuespecific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23(1):151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907
- Savchenko E.A., Andreeva N.A., Dmitrieva T.B. et al. Culturing of specialized glial cells (Olfactory Ensheathing Cells) of human olfactory epithelium. *Bull Exp Biol Med* 2005;139(4):510–3. DOI: 10.1007/s10517-005-0332-0
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(43):15545–50. DOI: 10.1073/pnas.0506580102
- Subramanian A., Kuehn H., Gould J. et al. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 2007;23(23):3251–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm369
- Wang X.X., Prager B.C., Wu Q.L. et al. Reciprocal signaling between glioblastoma stem cells and differentiated tumor cells promotes malignant progression. *Cell Stem Cell* 2018;22(4):514–28. DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.011
- Копылов А.М., Антипова О.А., Павлова Г.В. Молекулярные маркеры нейроонкогенеза при глиобластоме головного мозга. *Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко* 2022;86(6):99–105. DOI: 10.17116/neiro20228606199
- Kopylov A.M., Antipova O.A., Pavlova G.V. Molecular markers of neuro-oncogenesis in patients with glioblastoma. *Voprosy neurokhirurgii imeni N.N. Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery* 2022;86(6):99–105. (In Russ.). DOI: 10.17116/neiro20228606199
- Suva M.L., Rheinbay E., Gillespie S.M. et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* 2014;157(3):580–94. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.030
- Sancho-Martinez I., Nivet E., Xia Y. et al. Establishment of human iPSC-based models for the study and targeting of glioma initiating cells. *Nat Commun* 2016;7(1):10743. DOI: 10.1038/ncomms10743
- Gravendeel L.A.M., Kouwenhoven M.C.M., Gevaert O. et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res* 2009;69:9065–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2307
- Wang H., Lai Q., Wang D. et al. Hedgehog signaling regulates the development and treatment of glioblastoma. *Oncol Lett* 2022;24(3):294. DOI: 10.3892/ol.2022.13414
- Liu X., Zhao J., Wu Q. et al. ANKRD22 promotes glioma proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by upregulating E2F1-mediated MELK expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2023;82(7):631–40. DOI: 10.1093/jnen/nlad034
- Chen H., Gao S., Li J. et al. Wedelolactone disrupts the interaction of EZH2-EED complex and inhibits PRC2-dependent cancer. *Oncotarget* 2015;6(15):13049–59. DOI: 10.18632/oncotarget.3790
- Tang L., Peng L., Tan C. et al. Role of HOXA9 in solid tumors: mechanistic insights and therapeutic potential. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):349. DOI: 10.1186/s12935-022-02767-9
- Gonçalves C.S., Xavier-Magalhães A., Martins E.P. et al. A novel molecular link between HOXA9 and WNT6 in glioblastoma identifies a subgroup of patients with particular poor prognosis. *Mol Oncol* 2020;14(6):1224–41. DOI: 10.1002/1878-0261.12633
- Hurtado R., Ramirez A., Nabipur L. et al. The key role of the RPS14 gene in neoplasms and solid tumors. *J Assoc Genet Technol* 2023;49(3):121–6.
- Hu S., Cai J., Fang H. et al. RPS14 promotes the development and progression of glioma via p53 signaling pathway. *Exp Cell Res* 2023;423(1):113451. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113451
- Han H.J., Tokino T., Nakamura Y. CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 1998;7(6):1039–46. DOI: 10.1093/hmg/7.6.1039
- Annibaldi D., Whitfield J.R., Favuzzi E. et al. Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nat Commun* 2014;5(1):4632. DOI: 10.1038/ncomms5632
- Fukasawa K., Kadota T., Horie T. et al. CDK8 maintains stemness and tumorigenicity of glioma stem cells by regulating the c-MYC pathway. *Oncogene* 2021;40(15):2803–15. DOI: 10.1038/s41388-021-01745-1
- Ryskalin L., Lazzeri G., Flaiban M. et al. mTOR-dependent cell proliferation in the brain. *Biomed Res Int* 2017;2017:7082696. DOI: 10.1155/2017/7082696
- Mei J., Wang T., Xu R. et al. Clinical and molecular immune characterization of ERBB2 in glioma. *Int Immunopharmacol* 2021;94:107499. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107499
- Qin Z., Liang W., Zhang Z. et al. Activated KRAS reprograms neural progenitor cells to glioma stem cell-like phenotype. *Int J Oncol* 2023;63(1):88. DOI: 10.3892/ijo.2023.5536
- Koyama-Nasu R., Haruta R., Nasu-Nishimura Y. et al. The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 2014;33(17):2236–44. DOI: 10.1038/nc.2013.168

36. Fossdal G., Vik-Mo E.O., Sandberg C. et al. Aqp 9 and brain tumor stem cells. *Sci World J* 2012;2012:1–9. DOI: 10.1100/2012/915176
37. Wang S., Solenov E.I., Yang B. Aquaporin Inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 2023;1398:317–30. DOI: 10.1007/978-981-19-7415-1_22
38. Yan D., Yu Y., Ni Q. et al. The overexpression and clinical significance of TBX15 in human gliomas. *Sci Rep* 2023;13(1): 9771–83. DOI: 10.1038/s41598-023-36410-y
39. Li M., Wang J-F., Liu B. et al. Homeobox B2 is a potential prognostic biomarker of glioblastoma. *Rev Ass Med Bras* 2020;66:794–9. DOI: 10.1590/1806-9282.66.6.794
40. Liu Z., Wen P., Wang S. et al. HOXB2 Is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in colorectal cancer and glioma. 2023. Available at: https://assets.researchsquare.com/files/rs-2898626/v1_covered_17aba4e5-9b9f-43d0-bc4a-2ccf1552aef5.pdf?c=1684474189
41. Deng L., Zeng S., Yi Q. et al. High expression of six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 promotes the migration and invasion and predicts unfavorable prognosis in glioma. *Peer J* 2023;11:e15136. DOI: 10.7717/peerj.15136
42. Han M., Hu R., Wang S. et al. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 predicts poor prognosis and promotes glioblastoma growth and invasion. *Neoplasia* 2018;20 (6):543–54. DOI: 10.1016/j.neo.2018.04.002
43. Filippova N., Grimes J.M., Leavenworth J.W. et al. Targeting the TREM1-positive myeloid microenvironment in glioblastoma. *Neurooncol Adv* 2022;4(1):vdac149. DOI: 10.1093/oaajnl/vdac149
44. Ma K., Guo Q., Zhang X. et al. High expression of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 predicts poor prognosis in glioblastoma. *Onco Targets Ther* 2023;16:331–45. DOI: 10.2147/OTT.S407892
45. Siskind S., Brenner M., Wang P. TREM-1 modulation strategies for sepsis. *Front Immunol* 2022;13:907387. DOI: 10.3389/fimmu.2022.907387
46. Zhao X., Wang Y., Li J. et al. RFC2: a prognosis biomarker correlated with the immune signature in diffuse lower-grade gliomas. *Sci Rep* 2022;12 (1):3122–41. DOI: 10.1038/s41598-022-06197-5
47. Ho K.H., Kuo T.C., Lee Y.T. et al. Xanthohumol regulates miR-4749-5p-inhibited RFC2 signaling in enhancing temozolomide cytotoxicity to glioblastoma. *Life Sci* 2020;254:117807. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117807

Вклад авторов

В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, биоинформатический анализ полученных данных, написание текста статьи;
Н.Е. Арноцкая: подготовка образцов для анализа;
Т.И. Кушнир: обзор публикаций по теме статьи, статистический анализ данных;
А.С. Брюховецкий: транскриптомный анализ, научное редактирование.

Authors' contributions

V.E. Shevchenko: development of study design, bioinformatics analysis of the data obtained, article writing;
N.E. Arnotskaya: preparation of samples for analysis;
T.I. Kushnir: review of publications on the topic of the article, statistical data analysis;
A.S. Bryukhovetskiy: transcriptomic analysis, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>
Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>
Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
А.С. Брюховецкий / A.S. Bryukhovetskiy: <https://orcid.org/0009-0002-1583-1774>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Финансируется в рамках государственной темы (№ 2021-76).

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен локальными этическими комитетами ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и Клинического госпиталя «НейроВита» (Москва).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The protocol of the study was approved by the local ethics committee s of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia and of the Clinical Hospital “NeuroVita” (Moscow).

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

Статья поступила: 27.09.2023. **Принята к публикации:** 16.10.2023.

Article submitted: 27.09.2023. **Accepted for publication:** 16.10.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-149-156>

The effect of DNA methyltransferase 3A suppression in progression of the resistance phenotype in breast cancer cells

O.E. Andreeva¹, D.V. Sorokin^{1,2}, S.V. Vinokurova¹, Yu.Yu. Shchegolev¹, N.V. Elkina¹, A.N. Katargin¹, R.S. Faskhutdinov¹, D.I. Salnikova^{1,3}, A.M. Scherbakov^{1,2}, M.A. Krasil'nikov^{1,2}

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

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Gagarin Prospekt, Nizhny Novgorod 603950, Russia;

³Gause Institute of New Antibiotics; Bld. 1, 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia

Contacts: Olga Evgenievna Andreeva o.andreeva@ronc.ru,
Mikhail Alexandrovich Krasil'nikov krasilnikovm1@ya.ru

Introduction. Rearrangement of molecular pathways and activation of bypass signaling determine the progression of tumor cell resistance to various drugs. Study of the common features of resistant formation mechanisms is essential for breast and other cancer beneficial treatments.

Materials and methods. The present work was performed on estrogen receptor α ER α -positive (ER α – estrogen receptor α) MCF-7 breast cancer cells, established sublines resistant to the mTOR inhibitor rapamycin or antiestrogen tamoxifen, and ER α -negative MDA-MB-231 breast cancer cells. Methods used include MTT test, transient transfection, immunoblotting, real-time polymerase chain reaction and methylation analysis by bisulfite pyrosequencing.

Results. We have shown that the resistance of breast cancer cells to targeted and hormonal drugs is associated with the suppression of DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) and respective changes in DNA methylation; DNMT3A knockdown results in the partial resistance to both drugs demonstrating the pivotal role of DNMT3A suppression in the progression of cell resistance.

Conclusion. Totally, the results obtained highlight the possible mechanism of tumor cell resistance to targeting/hormonal drugs based on the deregulation of DNMTs expression and demonstrate direct connection between DNMT3A suppression and resistance progression.

Keywords: rapamycin, tamoxifen, drug resistance, MCF-7 cells, protein kinase AKT, DNA methyltransferase, LINE repeats

For citation: Andreeva O.E., Sorokin D.V., Vinokurova S.V. et al. The effect of DNA methyltransferase 3A suppression in progression of the resistance phenotype in breast cancer cells. *Uspеhi Molekularnoj Onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(4):149–56. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-149-156>

Феномен подавления ДНК-метилтрансферазы 3A при формировании резистентного фенотипа в клетках рака молочной железы

О.Е. Андреева¹, Д.В. Сорокин^{1,2}, С.В. Винокурова¹, Ю.Ю. Щеголев¹, Н.В. Елкина¹, А.Н. Катаргин¹, Р.С. Фасхутдинов¹, Д.И. Сальникова^{1,3}, А.М. Щербаков^{1,2}, М.А. Красильников^{1,2}

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

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

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»; Россия, Москва 119021, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Ольга Евгеньевна Андреева o.andreeva@ronc.ru,
Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@ya.ru

Введение. Переключение сигнальных путей и активация параллельных сигнальных каскадов относятся к ключевым факторам, определяющим развитие резистентности опухолевых клеток, и изучение механизмов подобной реаранжировки является одной из актуальных задач современной онкологии.

Материалы и методы. Настоящая работа выполнена на ER α -положительных (ER α – эстрогеновый рецептор α) клетках рака молочной железы MCF-7 и полученных из них сублиниях, устойчивых к ингибитору mTOR рапамицину или антиэстрогену тамоксифену, а также на ER α -отрицательных клетках рака молочной железы MDA-MB-231. Используемые методы включают тест МТТ, транзиторную трансфекцию, иммуноблоттинг, полимеразную цепную реакцию в реальном времени и анализ метилирования с помощью бисульфитного пиросеквенирования.

Результаты. Мы показали, что резистентность клеток рака молочной железы к таргетным и гормональным препаратам связана с подавлением ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) и соответствующими изменениями в метилировании ДНК. Нокдаун DNMT3A приводит к частичной резистентности к обоим препаратам, что демонстрирует ключевую роль подавления DNMT3A в развитии резистентности опухолевых клеток.

Заключение. В целом, полученные результаты свидетельствуют о возможном механизме формирования устойчивости опухолевых клеток к таргетным/гормональным препаратам, основанном на дерегуляции экспрессии DNMT, и демонстрируют прямую связь между подавлением DNMT3A и развитием резистентности.

Ключевые слова: рапамицин, тамоксифен, лекарственная устойчивость, клетки MCF-7, протеинкиназа АКТ, ДНК-метилтрансфераза, повторы LINE

Для цитирования: Андреева О.Е., Сорокин Д.В., Винокурова С.В. и др. Феномен подавления ДНК-метилтрансферазы 3A при формировании резистентного фенотипа в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):149–56. (На англ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-149-156>

INTRODUCTION

The development of acquired drug resistance of tumor cells is among the key factors limiting the efficiency of antitumor therapy [1–5]. There are various mechanisms which are respondent for the formation of the resistant phenotype of cancer cells, including the activation of ABC (ATP-binding cassette) transporters, mutations of targeted genes, rearrangement of signaling pathways, etc. [6–8]. Among them, the reconstruction of the epigenetic machinery belongs to the main events involved in the progression and maintenance of the low drug sensitivity of tumor cells [9–12]. DNA (de)methylation involved in the different regulation of genes is associated with the progression of tumor cells resistance, including genes encoding ABC transporters, growth signaling proteins, DNA repair enzymes, growth factors and receptors, etc. [13, 14].

DNA methyltransferases (DNMTs) belong to the key enzymes, which are responsible for DNA methylation and epigenetic regulation of gene expression [15, 16]. Several studies demonstrate various changes in the expression or activity of DNMTs in resistant tumors [17–19], however, the mechanism of the precise regulation of DNMTs is still unclear.

Earlier, we have shown that prolonged treatment of MCF-7 breast cancer cells with mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway inhibitors, rapamycin or metformin, resulted in the development of resistant clones characterized by constitutive activation of growth-related pathways [20, 21]. Because the activation of bypass growth signaling is among the key features of the acquired hormonal resistance, we proposed the existence of common mechanism respondent for the formation of cell resistance to both mTOR-targeting and hormonal agents.

Here we have shown that the progression of the resistance of breast cancer cells to targeted and hormonal drugs involved the suppression of DNMT3A axis and the respective changes in DNA methylation, and demonstrated the pivotal role of DNMT3A suppression in the progression of the cell resistance. Following studies will delineate the

mechanism of DNMT3A suppression in resistant tumors, and highlight the perspectives of the applying of these parameters as an additional criterion for the prognosis of tumor resistance.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and evaluation of antiproliferative activity. The MCF-7 cells (ATCC HTB-22) and MDA-MB-231 cells (ATCC HTB-26TM) were cultured at 37 °C and 5 % CO₂ in DMEM medium (PanEco, Russia) containing 4.5 g/l glucose and 10 % fetal bovine serum (HyClone, USA). Prolonged treatment of the parent MCF-7 cells with tamoxifen and rapamycin was used to obtain resistant sublines MCF-7/T and MCF-7/Rap respectively [20, 22]. The MTT assay [23] with modifications as described [24] was used to determine the cell response to the drugs after the treatment of the cells with tamoxifen or rapamycin.

Transfection of small interfering RNA. Scrambled non-specific siRNA and DNMT3A specific siRNA were purchased from Syntol. Oligonucleotides were dissolved in annealing buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA), annealed at 95 °C and used for transfection with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). The following sequences of siRNA were used in the study: scrambled siRNA 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', DNMT3A siRNA 5'-GCCAAGGUCAUUGCAGGAATT-3', with corresponding antisense sequences.

Total RNA isolation and quantitative real-time polymerase chain reaction. Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA by reverse transcription using the iScriptTM Advanced cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA). Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using 5X qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Russia) with the following conditions: initial denaturation for 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s, at Ta 60 °C for 15 s (Ta – temperature annealing), and at 72 °C for 30 s. All PCR reactions were performed in triplicate,

and gene expression was normalized relative to that of human β -Actin (ACTB), which was used as internal control. Primers used for RT-PCR are listed in table 1. Amplification and data analysis were performed on CFX96 touch RT-PCR Detection System (Bio-Rad, USA); Bio-Rad CFX Manager software v. 3.1 was used for threshold cycle (Ct) value calculations and data analysis. Relative mRNA expression was determined using the $\Delta\Delta$ Ct method [25].

Table 1. Sequence of primers used in real-time polymerase chain reaction

| Gene | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|
| <i>DNMT1</i> | CGACTACATCAA AGGCAGCAACCTG | TGGAGTGGACTTG TGGGTGTTCTC |
| <i>DNMT3a</i> | TGGCAGGATAG CCAAGTTCAG | GCTGGTCTTT GCCCTGCTTTATG |
| <i>ACTB</i> | ATGTGGCCGAGGA CTTTGATT | AGTGGGGTGG CTTTAGGATG |

Immunoblotting. Preparation of the cell lysates for immunoblotting was conducted as described previously in [26]. The lysates were separated by 10 % SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (PerkinElmer, USA), and processed as described earlier [27]. After the treatment with 5 % nonfat milk (Applichem, Germany) the membranes were incubated with primary antibodies (Cell Signaling Technology) overnight at +4 °C. For the standardization of loading, the antibodies against α -tubulin (Cell Signaling Technology, USA) were used; the secondary antibodies corresponding IgGs conjugated with horseradish peroxidase were provided by Jackson ImmunoResearch (USA). The detection was performed using Mruk and Cheng's protocol [28] and an ImageQuant LAS4000 system for chemiluminescence (GE HealthCare, USA). Densitometry for immunoblotting data was performed using ImageJ software (Wayne Rasband). The protocol for densitometry was provided by The University of Queensland with the recommendations from the work [29].

Table 2. Primers and pyrosequencing assays

| Gene | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') | Sequencing primer (5'-3') | Assay |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--|
| <i>LINE-1</i> | TGAGTTAGGTG TGGGATATAGT | bio~AAAATCAAAA AATCCCTTTC | GTTAGGTGTG GGATATAGTTT | YGTGGTGYG TYGTTTTTTAA GTYGGTTT GAAAAGYGTAATA TTYGGGTGGGA |
| <i>DNMT3A</i> cg03463641 | TAGTATTGGGGT TGGGGATAGTAG | bio~ACCTTAACCCTAT AAAACAAAATAACCTC | TAGTATTGGGGT TGGGGATAGTAG | YGTGGTTTA ATYGYGTYGTA ATTTTTAG |
| <i>DNMT3A</i> cg21629895 | TGGAAGATTTTGT GTGTGTTTATATAT | biotin-AAATCAAAAA CCTAAAACCCTAAAC | TGGAAGATTTTGT GTGTGTTTATATAT | YGTTTTTATTTT TTTATYGTGGGGG TTGTTTTTTTTTTTT ATGGAGYGTTT |

Note. Symbol Y represents C or T according to the IUPAC codes.

Methylation analysis by bisulfite pyrosequencing. Methylation analysis was carried out using a bisulfite pyrosequencing method. Briefly, genomic DNA was isolated using the ExtractDNA Blood & Cells kit (Evrogen, Russia) and modified with sodium bisulfite using the EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, USA) according to the manufacturer's protocol. Bisulfite treated DNA was amplified with a pair of gene-specific primers using 5x MaStaqDD PCR master mix (Dialat Ltd., Russia). One of these primers was biotinylated for subsequent immobilisation of a specific DNA-fragment onto a solid support (by biotin/streptavidin coupling). Primers and assays used for pyrosequencing are listed in table 2. The PCR products were sequenced by pyrosequencing PyroMark Q24 (Qiagen, Germany) using a specific sequencing primers (table 2). The obtained sequences were analyzed using PyroMark Q24 Advanced Software, which allows analysis of methylation levels of CpG sites.

Statistical analysis. Each experiment was repeated three times with three technical replicates. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel. Results were expressed as mean + SD (standard deviation value) if not stated explicitly. A *p*-value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

DNMT3A expression and cell resistance. The experiments were performed on MCF-7 breast cancer cells and rapamycin-resistant (MCF-7/Rap) and tamoxifen-resistant (MCF-7/T) sublines developed under prolonged treatment of the parent cells with mTOR inhibitor rapamycin or selective estrogen ER α modulator tamoxifen respectively [20, 22]. In a parallel, the study of the tamoxifen-resistant ER α -negative MDA-MB-231 breast cancer cells were performed.

Study of the DNA methylation enzymes showed the significant suppression of DNMT3A protein level in both MCF-7 resistant sublines, whereas the expression of DNMT1 was not changed significantly (fig. 1a). Similarly,

RT-PCR analysis revealed the marked decrease in the level of mRNA DNMT3A in the resistant cells when the level of mRNA DNMT1 was decreased slightly (fig. 1*b*). Similarly to the MCF-7 resistant sublines, the ER α -negative MDA-MB-231 cells were characterized with the marked decrease in the protein and mRNA level of DNMT3A when the DNMT1 level was even slightly increased (fig. 1*a, b*).

Cell resistance and DNA methylation. To investigate the effect of DNMT3A suppression on the global change in DNA methylation, we examined the methylation level of long interspersed nucleotide element 1 (LINE-1). LINE-1 is a major genetic element, making up ~17 % of the entire genome [30]. CpG sites located within LINE-1 and their methylation levels correlate with the global methylation status of genomic DNA and therefore often used as a surrogate marker for assessing global DNA methylation alterations [31].

The analysis of LINE-1 methylation in the resistant sublines revealed a slight decrease in that in tamoxifen- and rapamycin-resistant cells as well as in the MDA-MB-231 cell line (not significant) (fig. 2) supporting the repression of DNMT3A activity in the resistant cells.

In addition, we analyzed the methylation of regulatory sequences, a CpG-island (CGI) in the promoter of the DNMT3A gene and in transitional areas, termed shores, to elucidate potential mechanisms of suppression of DNMT3A expression in resistant cells. There were no significant changes in the DNA sequence methylation levels in the CGI and S-shore regions in the MCF-7/T and MCF-7/Rap resistant cells compared to the parental cell line. According to The Cancer Genome Atlas (TCGA) (breast cancer data collection, BRCA), increased methylation of S-shore region (genomic coordinates chr2:25565794–

25565842, hg19/Human) is associated with reduced DNMT3A expression. Thus, DNA methylation, at least of the S-shore region of DNMT3A gene, does not seem to be responsible for suppression of DNMT3A expression in resistant cells. In contrast, we found increased methylation in the CpG-island in DNMT3A promoter in MDA-MB-231 cells, which may be one of the reasons for the decreased DNMT3A activity in these cells (fig. 2).

Influence of DNMT3A knockdown on the cell resistance.

As can be seen in fig. 3, knockdown of DNMT3A by siRNA resulted in the progression of partial resistance of MCF-7 cells to both tamoxifen and rapamycin underlining the direct association between DNMT3A suppression and formation of the resistant phenotype.

Totally, we have revealed the pivotal role of suppression of DNMT3A in the formation of the cell resistant phenotype. Namely, we have described the suppression of DNMT3A axis in the rapamycin- and tamoxifen-resistant cells, and demonstrated the similar progression of partial cell resistance under DNMT3A knockdown; we have shown that suppression of DNMT3A axis was associated with the decrease in the DNA methylation. The following studies will delineate the prevalence of DNMT3A suppression among the resistant tumors, and reveal the possible applying of these parameters as the criteria of the cell resistance to targeting drugs.

DISCUSSION

The high level of tumor cell resistance to drug treatment is among the key factors determining the relatively low efficiency of anticancer therapy [2]. As known, long-term drug treatment is accompanied with the progression of acquired drug resistance of tumors, and, in the case of the specific targeting drugs, may be based on the rearrangement

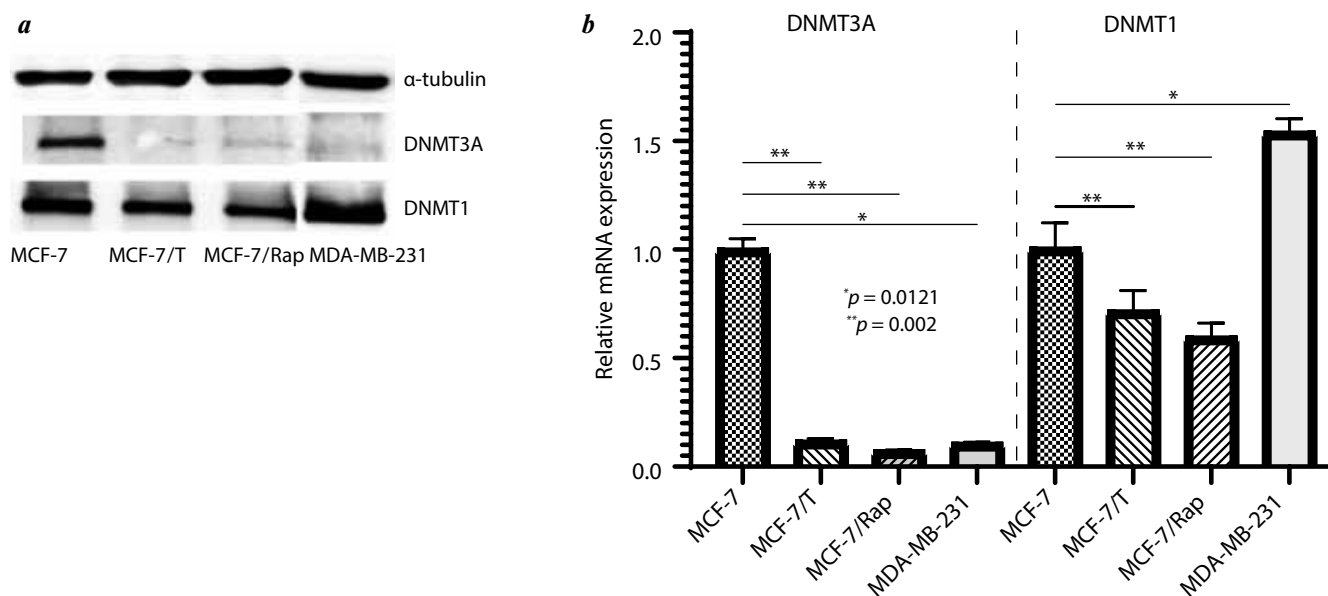


Fig. 1. DNMTs protein and RNA expression levels in the cell lines: *a* – Western blotting of the protein samples of MCF-7, MCF-7/T, MCF-7/Rap and MDA-MB-231 cells. Densitometry was used to quantify changes in protein expression; *b* – RT-PCR analysis of the expression of DNMT3A and DNMT1 in MCF-7, MCF-7/T, MCF-7/Rap and MDA-MB-231 cells

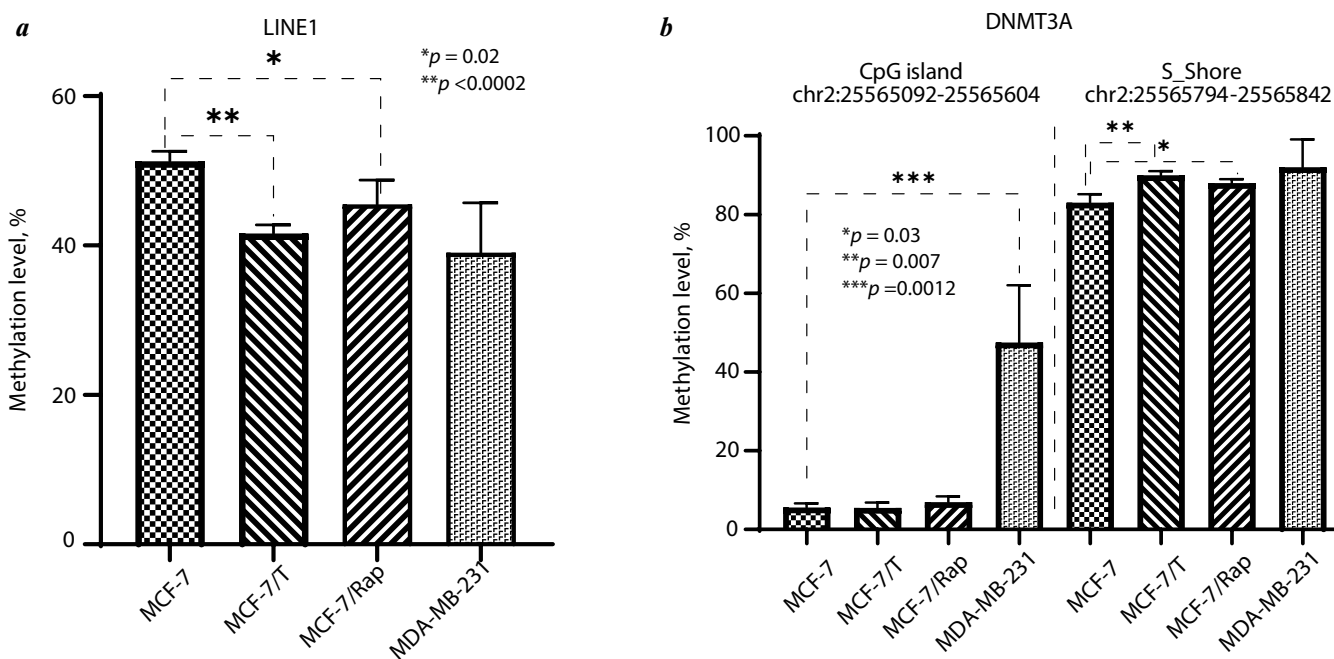


Fig. 2. Methylation levels in the studied cell lines: *a* – average methylation level of the six CpG dinucleotides in the LINE-1 region in MCF-7, MCF-7/Rap, MCF-7/T and MDA-MB-231 cells; *b* – average methylation of the four CpG dinucleotides within CpG-island (CGI) in the promoter of the DNMT3A gene and of the three CpGs in the adjacent N-shore sequence

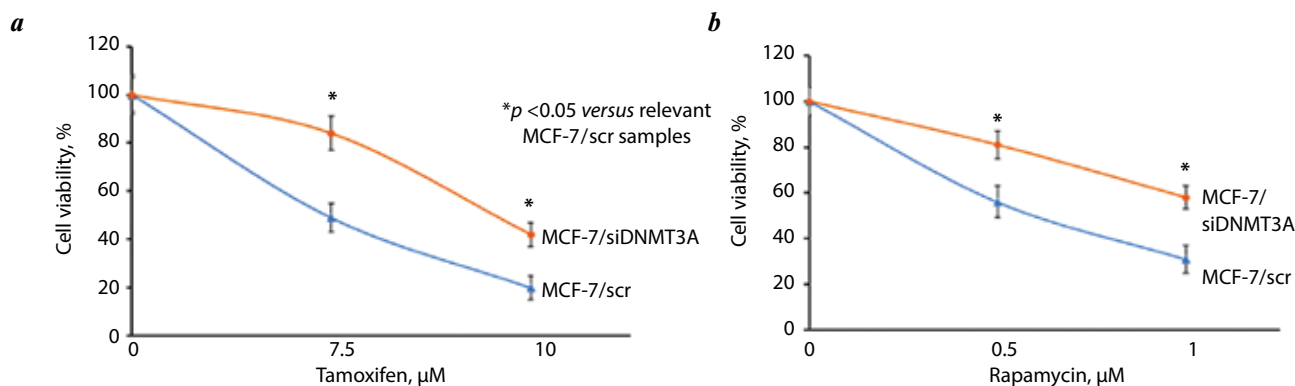


Fig. 3. The viability of MCF-7/scr and MCF-7/siDNMT3A cells after tamoxifen (*a*) and rapamycin (*b*) treatment. Data represent mean value \pm standard deviation of three independent experiments

signaling pathways respondent for the regulation of cell proliferation [3].

Similar to targeted drug resistance, progression of cell resistance to hormonal drugs possesses the common features, i.e. the rearrangement of signaling pathways and activation of bypass estrogen-independent pathways resulting in the restoration of cell proliferation [6]. A number of works, including our studies, described the changes in the profile of proteins and nucleic acids in the resistant cells [5, 20, 32–34], revealed microRNAs involved in the development of the resistance of tumor cells [35], and demonstrated the participation of exosomes in the transfer of hormonal resistance [36].

It should be noted that the mechanism of maintaining of cell signaling rearrangement and, in particular, the significance of epigenomic changes, i.e. DNA methylation, in the development of tumor cells resistance are currently

being actively studied using various experimental models [37]. ER α was found to regulate gene expression in breast cancer cells in part via DNA methylation whereas the loss of ER α results in the progression of estrogen resistance associated with the hypomethylation and overexpression of mitogen signaling genes [13]. Totally, the comparative analysis of the DNA methylation profile of the estrogen-sensitive and resistant breast cancer cells revealed number of genes hyper- or hypomethylated in the resistant cells [13, 14]. Among the recently studied genes some of histone variants overexpressed in the resistant cells [38], hypomethylation of Lactate dehydrogenase genes in the MCF-7 resistant clones [39] and some others. Earlier, using the panel of various MCF-7 resistant derivatives we have identified six coding genes, PRKCZ, TRAPPC9, ASIC2, C2CD4a, ZNF787 and CRTAC1, differentially methylated in the resistant cells [40].

In the present work, the expression and activity of the key DNA methyltransferases in the MCF-7 resistant sublines was analyzed. As revealed, both tamoxifen-resistant and rapamycin-resistant cells were characterized by common features – constitutive suppression of DNMT3A associated with hypomethylation of numerous DNA regulatory sequences. Knockdown of DNMT3A in parental MCF-7 cells was accompanied with the development of partial cell resistance to rapamycin and tamoxifen, indicating the involvement of DNMT3A in the formation of cell response to the tested drugs. The association of DNMT3A suppression with cell resistance was confirmed in the experiments on the

ER α -negative MDA-MB-231 breast cancer cells showing the low level of DNMT3A expression in MDA-MB-231 cells compared with the estrogen-dependent MCF-7 cells.

CONCLUSION

Totally, the results obtained highlight the possible mechanism of tumor cell resistance to targeting/hormonal drugs based on the deregulation of DNMTs expression and demonstrate direct connection between DNMT3A suppression and resistance progression; further studies are required to identify the factors involved in DNMT3 deregulation in the resistant cells.

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

- Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S. et al. The Different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Adv Pharm Bull* 2017;7(3):339–48. DOI: 10.15171/apb.2017.041
- Aleksakhina S.N., Kashyap A., Imyanitov E.N. Mechanisms of acquired tumor drug resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019;1872(2):188310. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188310
- Cree I.A., Charlton P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* 2017;17(1):10. DOI: 10.1186/s12885-016-2999-1
- Konjevic G., Mirjagic Martinovic K., Vuletic A. et al. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(1):1–11. DOI: 10.1007/s10585-006-9043-9
- Scherbakov A.M., Krasil'nikov M.A., Kushlinskii N.E. Molecular mechanisms of hormone resistance of breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2013;155(3):384–95. DOI: 10.1007/s10517-013-2160-y
- Clarke R., Tyson J.J., Dixon J.M. Endocrine resistance in breast cancer – an overview and update. *Mol Cell Endocrinol* 2015;418 Pt. 3(03):220–34. DOI: 10.1016/j.mce.2015.09.035
- Araki K., Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer* 2018;25(4):392–401. DOI: 10.1007/s12282-017-0812-x
- Citi V., Del Re M., Martelli A. et al. Phosphorylation of AKT and ERK1/2 and mutations of PIK3CA and PTEN are predictive of breast cancer cell sensitivity to everolimus in vitro. *Cancer Chem Pharmacol* 2018;81(4):745–54. DOI: 10.1007/s00280-018-3543-6
- Xie W., Sun H., Li X. et al. Ovarian cancer: epigenetics, drug resistance, and progression. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):1–16. DOI: 10.1186/s12935-021-02136-y
- Hazra A., Bose P., Sunita P. et al. Molecular epigenetic dynamics in breast carcinogenesis. *Arch Pharm Res* 2021;44(8):741–63. DOI: 10.1007/s12272-021-01348-0
- Andreeva O.E., Shchegolev Y.Y., Scherbakov A.M. et al. The phenomenon of the cross-resistance of breast cancer to target and hormonal drugs: the role of epigenetic reconstruction. *Med Sci Forum* 2023;20(1):5. DOI: 10.3390/IECC2023-14220
- Vinokurova S. Epigenetics of virus-induced tumors: perspectives for therapeutic targeting. *Curr Pharm Des* 2017;23(32):4842–61. DOI: 10.2174/1381612823666170822100627
- Ariazi E.A., Taylor J.C., Black M.A. et al. A new role for ER α : silencing *via* DNA methylation of basal, stem cell, and emt genes. *Mol Cancer Res* 2017;15(2):152–64. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0283
- Lin X., Li J., Yin G. et al. Integrative analyses of gene expression and DNA methylation profiles in breast cancer cell line models of tamoxifen-resistance indicate a potential role of cells with stem-like properties. *Breast Cancer Res* 2013;15(6):R119. DOI: 10.1186/bcr3588
- Jin B., Robertson K.D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013;754:3–29. DOI: 10.1007/978-1-4419-9967-2_1
- Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(1):23–38. DOI: 10.1038/npp.2012.112
- Jahangiri R., Mosaffa F., Emami Razavi A. et al. Altered DNA methyltransferases promoter methylation and mRNA expression are associated with tamoxifen response in breast tumors. *J Cell Physiol* 2018;233(9):7305–19. DOI: 10.1002/jcp.26562
- He D., Wang X., Zhang Y. et al. DNMT3A/3B overexpression might be correlated with poor patient survival, hypermethylation and low expression of ESR1/PGR in endometrioid carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas. *Chin Med J (Engl)* 2019;132(2):161–70. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000054
- Chen B.F., Chan W.Y. The *de novo* DNA methyltransferase DNMT3A in development and cancer. *Epigenetics* 2014;9(5):669–77. DOI: 10.4161/epi.28324
- Shchegolev Y.Y., Sorokin D.V., Scherbakov A.M. et al. Exosomes are involved in the intercellular transfer of rapamycin resistance in the breast cancer cells. *Bioimpacts* 2023;13(4):313–21. DOI: 10.34172/bi.2023.27490
- Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Tatarskiy V.V.Jr. et al. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB life* 2016;68(4):281–92. DOI: 10.1002/iub.1481
- Semina S.E., Scherbakov A.M., Kovalev S.V. et al. Horizontal transfer of tamoxifen resistance in MCF-7 cell derivatives: proteome study. *Cancer Invest* 2017;35(8):506–18. DOI: 10.1080/07357907.2017.1368081
- Iselt M., Holtei W., Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Arzneimittel-Forschung* 1989;39(7):747–9.
- Scherbakov A.M., Vorontsova S.K., Khamidullina A.I. et al. Novel pentacyclic derivatives and benzylidenes of the progesterone series cause anti-estrogenic and antiproliferative effects and induce apoptosis in breast cancer cells. *Invest New Drugs* 2023;41(1):142–52. DOI: 10.1007/s10637-023-01332-z
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods (San Diego, Calif)* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262

26. Scherbakov A.M., Komkov A.V., Komendantova A.S. et al. Steroidal pyrimidines and dihydrotriazines as novel classes of anticancer agents against hormone-dependent breast cancer cells. *Front Pharmacol* 2017;8:979. DOI: 10.3389/fphar.2017.00979
27. Scherbakov A.M., Lobanova Y.S., Shatskaya V.A. et al. Activation of mitogenic pathways and sensitization to estrogen-induced apoptosis: two independent characteristics of tamoxifen-resistant breast cancer cells? *Breast Cancer Res Treat* 2006;100(1):1–11. DOI: 10.1007/s10549-005-9075-x
28. Mruk D.D., Cheng C.Y. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: an inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 2011;1(2):121–2. DOI: 10.4161/spmg.1.2.16606
29. Taylor S.C., Berkelman T., Yadav G. et al. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* 2013;55(3):217–26. DOI: 10.1007/s12033-013-9672-6 PMID: 23709336
30. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409(6822):860–921. DOI: 10.1038/35057062
31. Yang A.S., Estecio M.R., Doshi K. et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3):e38. DOI: 10.1093/nar/gnh032
32. Dong C., Wu J., Chen Y. et al. Activation of PI3K/AKT/mTOR pathway causes drug resistance in breast cancer. *Front Pharmacol* 2021;12:628690. DOI: 10.3389/fphar.2021
33. Liu R., Chen Y., Liu G. et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis* 2020;11(9):797. DOI: 10.1038/s41419-020-02998-6
34. Scherbakov A.M., Basharina A.A., Sorokin D.V. et al. Targeting hormone-resistant breast cancer cells with docetaxel: a look inside the resistance. *Cancer Drug Resist* 2023;6(1):103–15. DOI: 10.20517/cdr.2022.96
35. Meng D., Li Z., Ma X. et al. MicroRNA-1280 modulates cell growth and invasion of thyroid carcinoma through targeting estrogen receptor alpha. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016;62(3):1–6.
36. Xu C.G., Yang M.F., Ren Y.Q. et al. Exosomes mediated transfer of lncRNA UCA1 results in increased tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20(20):4362–8.
37. Romero-Garcia S., Prado-Garcia H., Carlos-Reyes A. Role of DNA methylation in the resistance to therapy in solid tumors. *Front Oncol* 2020;10:1152. DOI: 10.3389/fonc.2020.01152
38. Nayak S.R., Harrington E., Boone D. et al. A role for histone H2B variants in endocrine-resistant breast cancer. *Horm Cancer* 2015;6(5–6):214–24. DOI: 10.1007/s12672-015-0230-5
39. Hamadneh L., Al-Lakkis L., Alhusban A.A. et al. Changes in Lactate production, lactate dehydrogenase genes expression and DNA methylation in response to tamoxifen resistance development in MCF-7 cell line. *Genes (Basel)* 2021;12(5). DOI: 10.3390/genes12050777
40. Андреева О.Е., Сигин В.О., Стрельников В.В. и др. Изменение профиля метилирования ДНК в тамоксифен-резистентных сублиниях клеток МСF-7. *Сибирский онкологический журнал* 2019;18(5):45–53. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-45-53
Andreeva O., Sigin V., Strelnikov V. et al. Changes in DNA methylation profile in tamoxifen-resistant MCF-7 sublines. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2019;18(5):45–53. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-45-53

Вклад авторов

О.Е. Андреева: разработка концепции исследования, редактирование, методология, транзиторная трансфекция;
 Д.В. Сорокин: иммуноблоттинг;
 С.В. Винокурова: разработка концепции исследования, анализ полученных данных, методология, редактирование;
 Ю.Ю. Щеголев: получение резистентных сублиний, проведение МТТ-теста;
 Н.В. Елкина: выделение РНК, проведение ПЦР, анализ полученных данных;
 А.Н. Катаргин: исследование метилирования, анализ полученных данных;
 Р.С. Фасхутдинов: исследование метилирования, анализ полученных данных;
 Д.И. Сальникова: проведение МТТ-теста;
 А.М. Щербakov: статистическая обработка данных, анализ полученных данных, подготовка иллюстративного материала;
 М.А. Красильников: идея и организация исследования, разработка концепции исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи.

Authors' contributions

O.E. Andreeva: development of the research concept, editing, methodology, transient transfection;
 D.V. Sorokin: immunoblotting;
 S.V. Vinokurova: development of the research concept, analysis of the data obtained, methodology, editing;
 Yu.Yu. Shchegolev: obtaining resistant sublines, conducting the MTT test;
 N.V. Elkina: RNA isolation, conducting the PCR, analysis of the obtained data;
 A.N. Katargin: methylation study, analysis of data obtained;
 R.S. Faskhutdinov: methylation study, analysis of data obtained;
 D.I. Salnikova: conducting the MTT test;
 A.M. Scherbakov: statistical data processing, analysis of the obtained data, preparation of illustrative material;
 M.A. Krasil'nikov: idea and organization of the study, development of the research concept, analysis of the data obtained, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

O.E. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-6015-6619>
 D.V. Sorokin: <https://orcid.org/0000-0002-1264-7405>
 S.V. Vinokurova: <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>
 Yu.Yu. Shchegolev: <https://orcid.org/0000-0002-1490-6781>
 N.V. Elkina: <https://orcid.org/0000-0002-0503-6016>
 A.N. Katargin: <https://orcid.org/0000-0002-7405-0671>
 R.S. Faskhutdinov: <https://orcid.org/0000-0002-0050-7798>
 D.I. Salnikova: <https://orcid.org/0000-0002-0809-3710>
 A.M. Scherbakov: <https://orcid.org/0000-0002-2974-9555>
 M.A. Krasil'nikov: <https://orcid.org/0000-0002-5902-7633>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The research was funded by the Russian Science Foundation (grant No. 19-15-00245; <https://rscf.ru/project/22-15-35008/>).

Финансирование. Исследование финансировалось Российским научным фондом (грант № 19-15-00245; <https://rscf.ru/project/22-15-35008/>).

Article submitted: 14.11.2023. **Accepted for publication:** 05.12.2023.

Статья поступила: 14.11.2023. **Принята к публикации:** 05.12.2023.