

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Сигнальные каскады — мишени
для терапии рака молочной железы*

*Баланс между обманом и адаптацией:
васкулогенная мимикрия как стратегия
выживания опухоли*

*Детектирование микросателлитной
нестабильности в образцах
колоректального рака*

*Копийность митохондриальных генов
и транскриптов микроРНК
при аденокарциноме эндометрия и миоме*

*Протеомный анализ плазмы крови
при диагностике аденокарциномы легкого*



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 .

1
ТОМ 12
'25

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

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

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

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

Выпускающий редактор

И.В. Пучкова

Корректор Е.С. Самойлова

Дизайн: Е.В. Степанова

Верстка: Е.В. Степанова

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

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

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

ISSN 2313-805X (Print)
ISSN 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2025. Том 12. № 1. 1–112.

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

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.

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

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Щербakov 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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



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

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2014

1 VOL. 12
'25

Founders:

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

Publisher

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

Editorial Office:

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

E-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Article submission:

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

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

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

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

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

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

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

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

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2025. Vol. 12 No. 1. 1–112.

© Design, layout PH "ABV-Press",
2025

Pressa Rossii catalogue index: 93562.

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EXECUTIVE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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)

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

Kzhyshevskaya, 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)

Jurisic, 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

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

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

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

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

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

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

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

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

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

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

Общие положения:

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

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

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Л.Ф. Гуляева, М.Л. Филипенко, Н.Е. Кушлинский

Сигнальные каскады — мишени для терапии рака молочной железы в свете данных полногеномного секвенирования 8

Е.А. Просекина, В.А. Шапкина, А.Е. Карпов, Е.Ю. Федоруцева, А.С. Артемьева

Баланс между обманом и адаптацией: васкулогенная мимикрия как стратегия выживания опухоли 14

О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, В.В. Синев, О.С. Малащенко, А.Н. Грачев

Les Liaisons dangereuses: парадоксальные результаты цитотоксической активности опухолевых макрофагов. 31

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.А. Лебедева, А.Н. Тараскина, А.И. Кавун, Е.В. Белова, Т.В. Григорьева, О.А. Кузнецова, Д.А. Кравчук, Л.Д. Беляева, В.Э. Никулин, Е.Д. Хоменко, В.А. Милейко, А.А. Трякин, М.Ю. Федянин, М.В. Иванов

Валидация тест-системы на основе высокопроизводительного секвенирования для детектирования микросателлитной нестабильности в образцах колоректального рака 41

М.К. Ибрагимова, Е.А. Кравцова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков

CNA-ландшафт HER2-негативного рака молочной железы при применении таксансодержащих схем неоадьювантной химиотерапии 53

Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, А.В. Иванов, А.М. Шишкин, В.В. Каминский, О.Б. Князева, И.А. Пучков, В.К. Боженко

Исследование противоопухолевой эффективности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас) на ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого 61

Н.Е. Кушлинский, С.Е. Куликова, Ф.А. Гугнин, С.Ю. Нежданова, А.Н. Грачев, Д.О. Уткин, Д.А. Цекатунов, И.Б. Рыжавская, Д.Н. Кушлинский, Е.С. Герштейн, И.С. Стилиди

Клинико-лабораторное значение растворимой формы клаудина-5 и VEGF при раке яичников 67

О.И. Кит, Е.М. Францияни, И.В. Каплиева, Д.С. Кутилин, И.В. Нескубина, В.А. Бандовкина, Л.К. Трепитаки, Е.И. Сурикова

Особенности копийности митохондриальных генов и транскриптов микроРНК в плазме крови больных аденокарциномой эндометрия и миомой 76

К.В. Ленкова, Р.М. Минязева, В.Л. Ахметова, И.Р. Гилязова, Р.И. Хусаинова, И.Р. Миннихметов

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, идентифицированных в ходе секвенирования нового поколения, с раком шейки матки. 84

Д.Н. Коробков, А.С. Кононихин, С.Д. Семенов, Е.Л. Кордзая, А.Г. Бржозовский, А.Е. Бугрова, Е.Ю. Васильева, Д.Ю. Каннер, Е.Н. Николаев, А.А. Комиссаров

Протеомный анализ плазмы крови как инструмент для персонализированной диагностики аденокарциномы легкого 96

НЕКРОЛОГ

Памяти академика Михаила Ивановича Давыдова. 109

REVIEWS

*L.F. Gulyaeva, M.L. Filipenko, N.E. Kushlinskii***Signaling cascades are targets for breast cancer therapy in the light of genome – wide sequencing data 8***E.A. Prosekina, V.A. Shapkina, A.E. Karpov, E.Yu. Fedorutseva, A.S. Artemyeva***The balance between deception and adaptation: vasculogenic mimicry as a tumor survival strategy 14***O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, V.V. Sinyov, O.S. Malashenko, A.N. Gratchev***Les Liaisons dangereuses: the paradoxical outcomes of the cytotoxic activity of tumor macrophages. 31**

EXPERIMENTAL REPORTS

*A.A. Lebedeva, A.N. Taraskina, A.I. Kavun, E.V. Belova, T.V. Grigor'eva, O.A. Kuznetsova, D.A. Kravchuk, L.D. Belyaeva, V.E. Nikulin, E.D. Khomenko, V.A. Mileyko, A.A. Tryakin, M.Yu. Fedyanin, M.V. Ivanov***Validation of high-throughput sequencing-based test system for detection of microsatellite instability in colorectal cancer samples. 41***M.K. Ibragimova, E.A. Kravtsova, M.M. Tsyganov, N.V. Litviakov***CNA landscape of HER2-negative breast cancer during administration of taxane-containing schemes of neoadjuvant chemotherapy 53***T.M. Kulinich, E.A. Kudinova, A.V. Ivanov, A.M. Shishkin, V.V. Kaminsky, O.B. Knyazeva, I.A. Puchkov, V.K. Bozhenko***Study of antitumor effectiveness of Ras GTPase peptide inhibitor (Inh-Ras) in xenograft model of non-small cell lung cancer 61***N.E. Kushlinskii, S.E. Kulikova, F.A. Gugin, S.Yu. Nezhdanova, A.N. Gratchev, D.O. Utkin, D.A. Tsekatunov, I.B. Ryzhavskaia, D.N. Kushlinskiy, E.S. Gershtein, I.S. Stilidi***Clinical and laboratory significance of soluble claudin-5 and VEGF in ovarian cancer 67***O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, I.V. Kaplieva, D.S. Kutilin, I.V. Neskubina, V.A. Bandovkina, L.K. Trepitaki, E.I. Surikova***Features of mitochondrial genes copy numbers and microRNA transcripts in endometrial adenocarcinoma and fibroids patients blood plasma 76***K.V. Lenkova, R.M. Minyazeva, V.L. Akhmetova, I.R. Gilyazova, R.I. Khusainova, I.R. Minniakhmetov***Search for associations of polymorphic variants of the *MTHFR*, *MET*, *CHEK2* genes, identified through next-generation sequencing, with cervical cancer. 84***D.N. Korobkov, A.S. Kononikhin, S.D. Semenov, H.L. Kordzaya, A.G. Brzhozovskiy, A.E. Bugrova, E.Yu. Vasilieva, D.Yu. Kanner, E.N. Nikolaev, A.A. Komissarov***Proteomic analysis of blood plasma as a tool for personalized diagnosis of lung adenocarcinoma 96**

OBITUARY

In memory of Academician Mikhail Ivanovich Davydov 109

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-8-13>

Сигнальные каскады – мишени для терапии рака молочной железы в свете данных полногеномного секвенирования

Л.Ф. Гуляева¹, М.Л. Филипенко², Н.Е. Кушлинский³

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»; Россия, 630060 Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12;

²ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630060 Новосибирск, ул. Академика Лаврентьева, 8;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Людмила Федоровна Гуляева lfgulyaeva@gmail.com

Развитие технологий секвенирования нового поколения позволяет выявлять множество вариантов генетического ландшафта в различных видах рака, в том числе рака молочной железы. Одним из частых генетических повреждений, обнаруживаемых с использованием полногеномного секвенирования, являются точечные мутации (миссенс-, нонсенс-мутации), делеции, инсерции, приводящие, как правило, к активации протоонкогенов и инактивации опухолевых супрессоров. Секвенирование генома злокачественных опухолей позволило, с одной стороны, выявить драйверные мутации в генах канцерогенеза того или иного органа, а с другой, использовать мутантные гены как мишени для таргетной терапии. Исследование биологических функций таких генов с точки зрения их вклада в канцерогенез помогает лучше понять его механизмы. В данном обзоре проанализированы сигнальные каскады рака молочной железы с выявленными мутантными генами – мишенями для таргетной терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, ДНК-секвенирование, сигнальный каскад, таргетная терапия

Для цитирования: Гуляева Л.Ф., Филипенко М.Л., Кушлинский Н.Е. Сигнальные каскады – мишени для терапии рака молочной железы в свете данных полногеномного секвенирования. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):8–13.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-8-13>

Signaling cascades are targets for breast cancer therapy in the light of genome – wide sequencing data

L.F. Gulyaeva¹, M.L. Filipenko², N.E. Kushlinski³

¹Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; 2/12 Timakova St., Novosibirsk 630060, Russia;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Akademika Lavrentieva St., Novosibirsk 630090, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Lyudmila Fyodorovna Gulyaeva lfgulyaeva@gmail.com

Development of next generation sequencing technologies allows to identify a large number of genetic landscape types in various cancers including breast cancer. Frequent genetic abnormalities identified using whole genome sequencing are point mutations (missense, nonsense mutations), deletions, insertions, which usually lead to activation of protooncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. Genome sequencing of malignant tumors allowed, on one hand, to identify driver mutations in carcinogenic genes in different organs, and on the other – to use mutated genes for targeted therapy. Study of biological functions of these genes from the point of view of their contribution to carcinogenesis allows to better understand its mechanism. In this review, signaling cascades of breast cancer with identified mutated genes – targets for therapy – are analyzed.

Keywords: breast cancer, DNA sequencing, signaling cascade, targeted therapy

For citation: Gulyaeva L.F., Filipenko M.L., Kushlinskii N.E. Signaling cascades are targets for breast cancer therapy in the light of genome – wide sequencing data. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):8–13. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-8-13>

ВВЕДЕНИЕ

Геномное профилирование опухолей на сегодняшний день является стандартом лечения многих типов злокачественных новообразований и становится все более важным в лечении рака молочной железы (РМЖ). Для РМЖ, как и других видов рака, характерны многочисленные геномные нарушения: амплификация генов, мутации, плоидность, потеря гетерозиготности и др. Когда такие повреждения затрагивают ключевые гены, регулирующие пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, происходят необратимые изменения метаболизма, сопровождающиеся злокачественной трансформацией клетки. Рассмотрим основные наиболее часто встречаемые генетические нарушения в компонентах сигнальных каскадов, характерных для РМЖ.

Наиболее частым событием является активация сигнальных каскадов, регулирующих клеточные процессы, такие как дифференцировка, пролиферация, апоптоз и многие другие жизненно важные молекулярные события. Она осуществляется с помощью разных механизмов и во многом определяется типом клетки и ее микроокружением. Чаще всего происходит гиперактивация сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) и фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/протеинкиназа B (AKT)/мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) из-за мутаций в генах *RAS*, *RAF*, *PTEN* и *PIK3CA*. Для РМЖ эти изменения тоже характерны, как и активация ряда других сигнальных каскадов.

СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД RAS/RAF/MAPK

Сигнальный каскад RAS/RAF/MAPK — один из ключевых путей, который активируется во многих злокачественных опухолях. Наиболее частым нарушением являются мутации в генах, кодирующих белки начального участка этого пути, а именно нерегулируемая активация рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Так, для РМЖ характерна амплификация или сверхэкспрессия трансмембранного белка HER2/neu (рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа), который принадлежит к семейству EGFR или ERBB. HER2/neu (ERBB2)-положительный РМЖ встречается довольно часто — приблизительно в 15–20 % случаев.

Развитие терапии, направленной против HER2/neu, кардинально изменило течение этого заболевания, которое ранее считали подтипом РМЖ, характеризующимся плохим прогнозом и высоким уровнем смертности. За последние 20 лет одобрен ряд методов лечения, позволяющих снизить уровень экспрессии

этого рецептора, которые уменьшают риск рецидивирования РМЖ и обеспечивают улучшение показателей выживаемости пациентов с заболеванием ранних стадий [1]. Более того, расширяются возможности проведения анти-HER2-таргетной терапии при РМЖ с низким уровнем экспрессии HER2 [2]. Параллельно активно проводятся исследования механизмов канцерогенеза, связанных с активацией данного рецептора. Оказалось, что в отличие от других членов семейства, внеклеточный домен HER2 не находится между активной и неактивной конформациями, а конститутивно существует в активированной конформации. Кроме того, этот рецептор не обладает лигандсвязывающей активностью, а его сигнальная функция обеспечивается гетеродимерными партнерами, связанными с лигандом [3]. Поэтому сверхэкспрессия HER2 приводит к увеличению димеров всех видов, содержащих его, что сопровождается пролиферативной активностью и усилением инвазии опухолевых клеток. Помимо амплификации для этого рецептора также характерны соматические мутации, эндоцитарная дисфункция, ускорение рециркуляции и нарушения деградации [4]. Достижения в области технологий секвенирования ДНК привели к широкому распространению секвенирования опухолевого генома, что расширило возможности выявления генетических нарушений HER2 и в других опухолях, таких как рак желудка, пищевода, толстой кишки, мочевого пузыря, эндометрия, легкого, слюнных желез и др. [5].

Для РМЖ также характерна высокая экспрессия рецептора эпидермального фактора роста 3 (HER3/Erbb3), тоже относящегося к семейству HER. Этот рецептор обладает низкой киназной активностью, что делает его неспособным эффективно фосфорилировать пептидные субстраты и запускать сигналы через гомодимеризацию [6]. Для активации нижестоящих путей HER3 должен димеризоваться с другими рецепторами, преимущественно с HER2 [7]. Повышенная экспрессия HER3 наблюдается в 50–70 % случаев РМЖ, при этом ему отводится ключевая роль в прогрессировании заболевания, развитии метастазов и лекарственной устойчивости при всех подтипах РМЖ [8]. По данным J. Uliano и соавт., этот показатель составляет 18–43 % [9]. Важно отметить, что из 4 HER-рецепторов HER3 преимущественно активирует путь PI3K/Akt [10]. Наиболее распространенным генетическим повреждением HER3 в злокачественных опухолях молочной железы являются активирующие мутации [11]. Данные cBioPortal, представленные по нескольким когортам ($n = 8521$), показывают, что примерно в 2 % случаев

РМЖ наблюдаются соматические мутации в *HER3*, при этом в ER-положительных (ER — рецептор эстрогена) опухолях этот показатель достигает 14 %. В настоящее время существуют несколько методов лечения, нацеленных на *HER3* (с использованием моноклональных, многоцелевых антител, конъюгатов антитело-лекарственное средство, низкомолекулярных ингибиторов и др.), которые находятся в стадии доклинических исследований и клинических испытаний [9]. Таким образом, выяснение основных механизмов, связанных с применением ингибиторов EGFR при РМЖ, и разработка новых стратегий, направленных на снижение уровня экспрессии разных рецепторов семейства HER (например, комбинированной терапии), остаются важными задачами современной молекулярной онкологии.

Нижестоящие после рецепторов белки RAS действуют как своеобразный клеточный переключатель внеклеточных сигналов от EGFR к временному образованию связанной с гуанозин-5'-трифосфатом (GTP) формы RAS, которая активирует различные нижестоящие сигнальные пути для регуляции фундаментальных клеточных процессов [12]. Результаты многочисленных исследований показали, что белок RAS является одним из наиболее разрегулируемых онкогенов во многих типах опухолей человека. И хотя о мутациях в гене *RAS* при РМЖ сообщается нечасто, гиперактивация передачи сигналов с участием этого онкогена играет большую роль в росте и прогрессировании данной опухоли. Результаты недавних исследований продемонстрировали, что у 14 % пациентов с РМЖ наблюдались мутации в кодоне 12 гена *KRAS*, у 10 % — в кодоне 13 данного гена, при этом увеличение уровня его матричной РНК (мРНК) взаимосвязано с Т- и N-стадиями и 5-летней выживаемостью [13]. Измерение уровней мРНК для *KRAS*, *HRAS* и *NRAS* с использованием микрочипа Affymetrix HG-U133A показало связь высокого уровня мРНК N-RAS с наиболее агрессивным подтипом РМЖ — трижды негативным [14]. Поскольку разработка ингибиторов RAS не привела к успеху, что связывают с особенностями структуры малых G-белков, акцент был сделан на изучении механизмов регуляции его активности. Такой подход послужил основой для создания новых терапевтических подходов. Результаты недавних исследований показали перспективность терапии РМЖ с применением ингибиторов ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации RAS, таких как фарнезилтрансфераза и геранилтрансфераза, и противоопухолевых препаратов, нацеленных на стоящие выше (EGFR) и ниже (RAF, MAPK) молекулы каскада [15]. Данные, полученные в ходе исследований, подчеркивают необходимость дальнейшего изучения белков семейства RAS при РМЖ.

Мутация V600E в протоонкогене *BRAF* RAS-регулируемой цитоплазматической серин-треонинкиназы часто выявляется при различных злокачественных новообразованиях, однако редко встречается при

РМЖ. Имеются лишь единичные сообщения об успешном лечении вемурафенибом РМЖ с мутантным *BRAF* [16].

В настоящее время активно ведутся исследования по использованию ферментов этого сигнального каскада в качестве мишеней для таргетной терапии. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) одобрило несколько методов лечения, которые ингибируют путь MAPK и уменьшают прогрессирование метастазов при РМЖ [17]. Чаще всего используются такие препараты, которые регулируют или ингибируют сигнальный путь MAPK, как ингибиторы фарнезилтрансферазы, сорафениб, вемурафениб, PLX8394, дабрафениб, уликсертиниб, симвастин, алисертиб и тифлуноmid.

СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД PI3K/АКТ/MTOR

Заметные успехи достигнуты в лечении РМЖ ингибиторами другого сигнального каскада — PI3K/АКТ/mTOR. У млекопитающих это сигнальный путь, участвующий в пролиферации, выживании, инвазии, миграции, апоптозе, метаболизме глюкозы и репарации ДНК. Оказалось, что до 40 % мутаций в *PIK3CA* регистрируются в ER-положительном и HER2-отрицательном первичном и метастатическом РМЖ [18]. Рецепторы эпидермального фактора роста HER1, HER2, HER3 и HER4, представляющие собой мембранные рецепторные тирозинкиназы, участвуют в передаче сигналов HER, к которым могут быть присоединены различные лиганды, что приводит к активации сигнального пути PI3K/АКТ. Этот сигнальный каскад активирован почти в 70 % злокачественных опухолей молочной железы [19]. При ER- и HER2-положительном РМЖ наиболее частым механизмом аномальной активации пути PI3K/АКТ являются мутации в гене *PIK3CA*, которые при люминальном А подтипе (ER+/HER2-) встречаются в 47 % случаев, при люминальном В подтипе (ER+/HER2+) — в 33 %, при ER-/HER2+-подтипе — в 23–39 %, при трижды негативном РМЖ — в 8–25 % [20]. При HER2-положительном РМЖ мутации в *PIK3CA* связаны с худшим прогнозом [21]. При распространенном и метастатическом РМЖ мутации в *PIK3CA* могут привести к устойчивости к химиотерапии и плохому прогнозу [22].

При трижды негативном РМЖ наиболее распространенными аномальными механизмами PI3K/АКТ являются инактивация и снижение активности белка PTEN (67 % случаев) [23]. Важно отметить, что путь PI3K/АКТ/mTOR участвует в поддержании резистентности к гормональной терапии и является мишенью многих новых препаратов для лечения ER-положительного РМЖ. Ингибирование ключевых компонентов этого сигнального пути может оказывать противоопухолевое действие. При ER-положительном РМЖ активация пути PI3K, вызванная мутацией в гене *PIK3CA*, способствует лиганднезависимой активации

ER, что является одним из важных механизмов резистентности к гормональной терапии [24]. Ингибирование PI3K может задержать или преодолеть резистентность к этой терапии, что способствует улучшению прогноза. Кроме того, активация АКТ способствует формированию устойчивости к противораковым агентам, таким как антагонисты ER тамоксифен и фулвестрант. Комбинация ингибиторов АКТ с данными препаратами может повысить их эффективность.

Важно отметить, что в PI3K-путях РМЖ могут наблюдаться множественные изменения. Например, обнаружено сосуществование мутации в *PIK3CA*, делеции в *PTEN* и амплификации *HER2* [25]. В таком случае ингибирование одной мишени может не достичь противоопухолевого эффекта, поскольку остаются другие мишени, активирующие пролиферативные сигнальные каскады. Данная ситуация предполагает не только молекулярный механизм лекарственной устойчивости РМЖ, но и возможность комбинированной терапии. В 2023 г. завершено исследование SOLAR-1, посвященное изучению эффективности селективного ингибитора PI3K алпелисиба, одобренного для лечения распространенного РМЖ с мутацией в *PIK3CA* [26]. В него включены пациенты с ER-положительным/HER2-отрицательным РМЖ (33 977 образцов опухоли и 1587 образцов крови для жидкой биопсии). В ходе этого исследования выявлены 11 замен в экзонах 7, 9 и 20 в *PIK3CA* (SOLAR1m). С использованием комплексного геномного профилирования мутантный PIK3CA обнаружен в 11 767 из 33 977 (35%) образцов тканей, включая 2300 (7 %) образцов с OTHERm и без SOLAR1m. Это свидетельствует о том, что применение алпелисиба при ER-положительном/HER2-отрицательном РМЖ принесет терапевтическую пользу.

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ HEDGEHOG

В настоящее время активно ведутся исследования по поиску маркеров других сигнальных каскадов. Сигнальный путь Hedgehog (Hh) играет большую роль в эмбриональном развитии, регенерации тканей и обновлении стволовых клеток. Показано значение канонической и неканонической передач сигналов Hh при РМЖ [27]. Этот сигнальный каскад вовлечен в развитие и гомеостаз молочной железы, а также способствует прогрессированию различных подтипов РМЖ. Вклад сигнального пути Hh в онкогенез и прогрессирование РМЖ, его прогностическая роль и значение как терапевтической мишени варьируют в зависимости от молекулярных, клинических и гистопатологических характеристик пациентов с данной патологией. Показано вовлечение сигнального пути Hh в патофизиологические механизмы при трижды негативном РМЖ, при этом данный каскад может пересекаться с другими ключевыми сигнальными путями, что обуславливает эффективность терапии, направленной на компоненты Hh [28].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ WNT

Сигнальный путь Wnt является высоко консервативным сигнальным каскадом, который контролирует развитие эмбриона и органов, а также прогрессирование рака. Полногеномное секвенирование и анализ профиля экспрессии генов показали, что сигнальный путь Wnt участвует главным образом в пролиферации и метастазировании РМЖ. Результаты исследований последних лет продемонстрировали, что передача сигналов Wnt имеет решающее значение для регуляции иммунного микроокружения РМЖ, поддержания стволовости, терапевтической устойчивости, формирования фенотипа и т. д. [29].

Каноническая передача сигналов Wnt (также известная как передача сигналов Wnt-β-катенин) является наиболее изученным путем и обычно запускается лигандами Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8b, Wnt10a и Wnt10b. Передача сигналов Wnt-PCP не включает молекулы β-катенина, LRP или TCF и чаще всего запускается Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7b и Wnt11. Передача сигналов Wnt/Ca²⁺ играет главную роль в судьбе клеток во время раннего эмбриогенеза, межнейронной коммуникации, прогрессирования рака. Все эти варианты вносят разный вклад в прогрессирование РМЖ [30]. Для того или иного подтипа РМЖ характерна активация различных компонентов сигнального пути Wnt, что открывает новые возможности для таргетной терапии [31].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NOTCH

Высококонсервативный сигнальный путь Notch также играет большую роль в клеточной дифференцировке, выживании, пролиферации, обновлении стволовых клеток и определении судьбы клеток во время развития и морфогенеза. Гены Notch кодируют трансмембранные рецепторы, которые первоначально были идентифицированы как ответственные за специфический фенотип в форме «выемки» на крыльях *Drosophila melanogaster* [32]. У млекопитающих имеется ортолог (Notch 1) единственного рецептора Notch дрозофилы, а также 3 дополнительных рецептора Notch (Notch 2, 3, 4). Результаты исследований показали, что нарушение регуляции сигнального пути Notch способствует канцерогенезу, обновлению опухолевых стволовых клеток, ангиогенезу и развитию химиорезистентности. Повышенные уровни рецепторов и лигандов Notch связаны с прогрессированием рака и низкими показателями выживаемости.

Сигнальный путь Notch также регулирует транскрипционную активность ключевых генов-мишеней, пересекаясь с несколькими другими сигнальными путями. Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что сигнальный путь Notch может служить терапевтической мишенью при некоторых видах рака, включая РМЖ [33]. Результаты исследований продемонстрировали противоопухолевые свойства ингибиторов Notch при различных типах рака. В настоящее

время проводятся клинические испытания, в ходе которых изучается противоопухолевая эффективность ингибиторов Notch. Однако, поскольку существует множество рецепторов Notch, которые могут оказывать либо онкогенное, либо опухолесупрессирующее действие в различных клетках, важно, чтобы ингибиторы Notch были специфичны к конкретным рецепторам, являющимся канцерогенными по своей природе.

ДРУГИЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

В последнее время особая роль в обеспечении высокой степени злокачественности отводится эпителиально-мезенхимальному переходу как ключевому механизму метастазирования. На моделях ксенотрансплантата РМЖ показано, что морфогенетический белок 2 (BMP-2) способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию в кости. Продemonстрировано также, что подавление онкосупрессорного белка Rb с помощью BMP-2 связано с опосредованной убиквитином деградацией, активируемой фосфорилированием Rb через сигнальный путь PI3K/АКТ [34]. Кроме того, сигнальные пути Smad участвуют в усилении экспрессии белка CD44 с помощью BMP-2. Высказано предположение, что между сигнальными путями Rb и CD44 существуют перекрестные помехи, поскольку обнаружено, что рекомбинантный человеческий BMP-2 (rhBMP-2) регулирует экспрессию CD44 частично посредством

сигналов Rb. В клинических образцах РМЖ BMP-2 положительно коррелировал с экспрессией CD44 и отрицательно — с экспрессией Rb. На основе результатов *in vitro* и *in vivo* установлен интегрированный механизм, с помощью которого rhBMP-2 индуцирует ЕМТ и стволовость клеток РМЖ через сигнальные пути Rb и CD44, которые затем способствуют метастазированию. Таким образом, использование ингибиторов против белков MBP-2 может быть новой стратегией для терапии метастазирующего РМЖ [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накоплен большой массив данных о геноме злокачественных опухолей, в том числе РМЖ. Многие мутации показали клиническую значимость и используются для таргетной терапии. Особенно это касается компонентов различных сигнальных путей, контролирующих процессы пролиферации, дифференцировки и инвазии в клетках молочной железы. В первую очередь к ним можно отнести мутантные белки сигнальных каскадов RAS/RAF/MAPK и PI3K/АКТ/mTOR. Перспективными мишенями могут быть также белки сигнальных путей Hh, Wnt и Notch, однако для подтверждения этого необходимо проведение клинических испытаний. В любом случае на сегодняшний день в лечении РМЖ наблюдается существенный прогресс, позволяющий увеличить выживаемость больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Marti J.L.G., Hyder T., Nasrazadani A. et al. The evolving landscape of HER2-directed breast cancer therapy. *Curr Treat Options Oncol* 2020;21(10):82. DOI: 10.1007/s11864-020-00780-6
- Tarantino P., Viale G., Press M.F. et al. ESMO expert consensus statements (ECS) on the definition, diagnosis, and management of HER2-low breast cancer. *Ann Oncol* 2023;34(8):645–59. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.05.008
- Ferguson K.M. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 2008;37:353–73. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125829
- Li X., Zhao L., Chen C. et al. Can EGFR be a therapeutic target in breast cancer? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2022;1877(5):188789. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188789
- Raghav K.P.S., Moasser M.M. Molecular pathways and mechanisms of HER2 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2023;29(13):2351–61. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0283
- Lyu H., Han A., Polsdofer E. et al. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer. *Acta Pharm Sin B* 2018;8(4):503–10. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.05.010
- Kilroy M.K., Park S., Feroz W. et al. HER3 alterations in cancer and potential clinical implications. *Cancers (Basel)* 2022;14(24):6174. DOI: 10.3390/cancers14246174
- Papa F., Grinda T., Rassy E. et al. Long road towards effective HER3 targeting in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2024;129:102786. DOI: 10.1016/j.ctrv.2024.102786
- Uliano J., Corvaja C., Curigliano G., Tarantino P. Targeting HER3 for cancer treatment: a new horizon for old target. *ESMO Open* 2023;8(1):100790. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.100790
- Hoxhaj G., Manning B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2020;20(2):74–88. DOI: 10.1038/s41568-019-0216-7
- Mishra R., Alanazi S., Yuan L. et al. Activating HER3 mutations in breast cancer. *Oncotarget* 2018;9(45):27773–88. DOI: 10.18632/oncotarget.25576
- Murugan A.K., Grieco M., Tsuchida N. RAS mutations in human cancers: roles in precision medicine. *Semin Cancer Biol* 2019;59:23–35. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.007
- Kamian S., Ashoori H., Vahidian F., Davoudi S. The relevance of common *K-RAS* gene mutations and *K-RAS* mRNA expression with clinicopathological findings and survival in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2023;24(3):909–14. DOI: 10.31557/APJCP.2023.24.3.909
- Banys-Paluchowski M., Milde-Langosch K., Fehm T. et al. Clinical relevance of H-RAS, K-RAS, and N-RAS mRNA expression in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2020;179(2):403–14. DOI: 10.1007/s10549-019-05474-8
- Hossain M.A. Targeting the RAS upstream and downstream signaling pathway for cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2024;979:176727. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176727
- Wang L., Lu Q., Jiang K. et al. BRAF V600E mutation in triple-negative breast cancer: a case report and literature review. *Oncol Res Treat* 2022;45(1–2):54–61. DOI: 10.1159/000520453
- Khojasteh Poor F., Keivan M., Ramazii M. et al. Mini review: the FDA-approved prescription drugs that target the MAPK signaling pathway in women with breast cancer. *Breast Dis* 2021;40(2):51–62. DOI: 10.3233/BD-201063

18. Miricescu D., Totan A., Stanescu-Spinu I.I. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects. *Int J Mol Sci* 2020;22(1):173. DOI: 10.3390/ijms22010173
19. Hinz N., Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 2019;17(1):154. DOI: 10.1186/s12964-019-0450-3
20. Nunnery S.E., Mayer I.A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer. *Drugs* 2020;80(16):1685–97. DOI: 10.1007/s40265-020-01394-w
21. Shen L.S., Jin X.Y., Wang X.M. et al. Advances in endocrine and targeted therapy for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer. *Chin Med J* 2020;133:1099–108. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000745
22. Mosele F., Stefanovska B., Lusque A. et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2020;31(3):377–86. DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.006
23. Ertay A., Liu H., Liu D. et al. WDHD1 is essential for the survival of PTEN-inactive triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis* 2020;11(11):1001. DOI: 10.1038/s41419-020-03210-5
24. Hanker A.B., Sudhan D.R., Arteaga C.L. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2020;37(4):496–513. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.009
25. Endicott S.J., Ziemba Z.J., Beckmann L.J. et al. Inhibition of class I PI3K enhances chaperone-mediated autophagy. *J Cell Biol* 2020;219(12):202001031. DOI: 10.1083/jcb.202001031
26. Rugo H.S., Raskina K., Schrock A.B. et al. Biology and targetability of the extended spectrum of PIK3CA mutations detected in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2023;29(6):1056–67. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2115
27. Riobo-Del Galdo N.A., Montero Á.L., Wertheimer E.V. Role of Hedgehog signaling in breast cancer: pathogenesis and therapeutics. *Cells* 2019;8(4):375. DOI: 10.3390/cells8040375
28. Habib J.G., O'Shaughnessy J.A. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Med* 2016;5(10):2989–3006. DOI: 10.1002/cam4.833
29. Patel D.K., Kesharwani R., Verma A. et al. Scope of Wnt signaling in the precise diagnosis and treatment of breast cancer. *Drug Discov Today* 2023;28(7):103597. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103597
30. Xu X., Zhang M., Xu F., Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer* 2020;19(1):165. DOI: 10.1186/s12943-020-01276-5
31. Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J. et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):66. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2
32. Theodosiou A., Arhondakis S., Baumann M., Kossida S. Evolutionary scenarios of Notch proteins. *Mol Biol Evol* 2009;26(7):1631–40. DOI: 10.1093/molbev/msp075
33. Krishna B.M., Jana S., Singhal J. et al. Notch signaling in breast cancer: from pathway analysis to therapy. *Cancer Lett* 2019;461:123–31. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.07.012
34. Huang P., Chen A., He W. et al. BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44. *Cell Death Discov* 2017;3:17039. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.39
35. Nilendu P., Kumar A., Kumar A. et al. Breast cancer stem cells as last soldiers eluding therapeutic burn: a hard nut to crack. *Int J Cancer* 2018;142(1):7–17. DOI: 10.1002/ijc.30898

Вклад авторов

Л.Ф. Гуляева: анализ данных литературы, написание текста статьи;

М.Л. Филипенко: обзор литературы по теме статьи, проведение системного анализа, редактирование;

Н.Е. Кушлинский: анализ полученных данных, редактирование.

Authors' contributions

L.F. Gulyaeva: analysis of literature data, article writing;

M.L. Filipenko: literature review on the topic of the article, system analysis, editing;

N.E. Kushlinskii: analysis of the received data, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.Ф. Гуляева / L.F. Gulyaeva: <https://orcid.org/0000-0002-7693-3777>

М.Л. Филипенко / M.L. Filipenko: <https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>

Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinskii: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по теме «Постгеномные высокотехнологичные исследования механизмов развития социально значимых заболеваний и стресс-индуцированных состояний».

Funding. The work was carried out within the framework of the budget project of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine on the topic "Post-genomic high-tech studies of the mechanisms of development of socially significant diseases and stress-induced conditions".

Статья поступила: 30.10.2024. **Принята к публикации:** 24.12.2024. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 30.10.2024. **Accepted for publication:** 24.12.2024. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-14-30>

Баланс между обманом и адаптацией: васкулогенная мимикрия как стратегия выживания опухоли

Е.А. Просекина¹, В.А. Шапкина², А.Е. Карпов¹, Е.Ю. Федоруцева³, А.С. Артемьева¹¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9;³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, пр-кт Ленина, 36**Контакты:** Елизавета Андреевна Просекина elizaveta.prosekina@gmail.com

Васкулогенная мимикрия представляет собой уникальный процесс, при котором опухолевые клетки имитируют нормальные эндотелиальные клетки сосудов с целью обеспечения себе доступа к кровоснабжению. В настоящем обзоре рассмотрены молекулярные механизмы, предшествующие этому явлению, а также его важность в контексте развития солидных опухолей. Мы проанализировали стратегии выживания опухолевых клеток, использующих васкулогенную мимикрию, и описали потенциальные терапевтические подходы, направленные на подавление роста и метастазирования опухоли. Освещение методов гистологической и молекулярной идентификации васкулогенной мимикрии способствует лучшему пониманию данного феномена и его ранней диагностике. В обзоре акцентируется внимание на необходимости дальнейших исследований васкулогенной мимикрии для формирования представлений о механизмах, лежащих в основе канцерогенеза. Мы проанализировали результаты 109 работ, представленных в ведущих биомедицинских базах данных, включая SciVerse Scopus, PubMed, Web of Science и РИНЦ (Российский индекс научного цитирования), что позволило обобщить актуальные научные данные и выявить ключевые тенденции в области молекулярной онкологии.

Ключевые слова: васкулогенная мимикрия, ангиогенез, канцерогенез**Для цитирования:** Просекина Е.А., Шапкина В.А., Карпов А.Е. и др. Баланс между обманом и адаптацией: васкулогенная мимикрия как стратегия выживания опухоли. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):14–30.DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-14-30>

The balance between deception and adaptation: vasculogenic mimicry as a tumor survival strategy

E.A. Prosekina¹, V.A. Shapkina², A.E. Karpov¹, E.Yu. Fedorutseva³, A.S. Artemyeva¹¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;²Saint Petersburg State University; 7/9 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia³National Research Tomsk State University; 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russia**Contacts:** Elizaveta Andreevna Prosekina elizaveta.prosekina@gmail.com

Vasculogenic mimicry is a unique process through which tumor cells imitate normal vascular endothelial cells to secure access to the blood flow. In this review, we consider molecular mechanisms underlying this phenomenon and its importance in the context of solid tumor development. We have analyzed survival strategies of tumor cells using vasculogenic mimicry and described potential therapeutic approaches aimed at tumor growth and metastasis suppression. Highlighting the methods of histological and molecular identification of vasculogenic mimicry promotes better understanding of this phenomenon and its early diagnosis. The review focuses on the necessity of further research in the area of vasculogenic mimicry to conceptualize mechanisms underlying carcinogenesis. We have analyzed 109 articles from the leading biomedical databases including SciVerse Scopus, PubMed, Web of Science and RSCI (Russian

Science Citation Index) which allowed us to summarize current scientific data and identify the key trends in the area of molecular oncology.

Keywords: vasculogenic mimicry, angiogenesis, carcinogenesis

For citation: Prosekina E.A., Shapkina V.A., Karpov A.E. et al. The balance between deception and adaptation: vasculogenic mimicry as a tumor survival strategy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):14–30. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-14-30>

ВВЕДЕНИЕ

Кровоснабжение опухоли оказывает большое влияние на ее развитие и прогрессирование. Этот процесс происходит за счет различных стратегий, таких как васкулогенез, ангиогенез, кооптация сосудов и васкулогенная мимикрия (ВМ). Васкулогенез представляет собой процесс образования новых кровеносных сосудов *de novo*, тогда как ангиогенез — это ремоделирование существующей сосудистой сети. Кооптация сосудов является неангиогенным процессом, при котором опухолевые клетки используют уже существующие сосуды хозяина для своих потребностей в кровоснабжении [1].

В основе опухолевого неоангиогенеза лежат тесные взаимодействия опухолевого микроокружения и стимулирующих ангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и другие, а также провоспалительных цитокинов — интерферонов, фактора некроза опухоли α (TNF- α), трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и других, продуцируемых и выделяемых клетками во время гипоксии, гипогликемии, воспаления и иных процессов [2]. Эти факторы активируют проангиогенные сигнальные пути, преимущественно стимулируя эндотелиальные клетки, которые начинают мигрировать вдоль градиента концентрации и присоединяться к существующим сосудам, формируя новую сосудистую сеть внутри опухоли. На основе этих механизмов разработаны различные стратегии антиангиогенной терапии ряда опухолей, включающие использование антител или ингибиторов тирозинкиназ. Тем не менее результаты испытаний новых таргетных препаратов с антиангиогенной активностью, таких как бевацизумаб, рамуцирумаб и сорафениб, оказались неоднозначными: хотя начальный ответ часто был положительным, впоследствии нередко наблюдались рецидив и прогрессия опухоли. Постепенно стало очевидно, что лишение опухолей доступа к кровоснабжению является сложной задачей. При проведении антиангиогенной терапии опухолевые клетки способны адаптироваться к ней, используя различные стратегии обхода [3], которые включают использование альтернативных ангиогенных путей, в том числе ВМ.

Термин «васкулогенная мимикрия» (“vasculogenic mimicry”) обозначает способность некоторых клеток

формировать проводящие структуры внутри опухоли без участия эндотелиальных клеток (рис. 1). Впервые это явление в 1999 г. зафиксировали A.J. Maniotis и соавт. [4], наблюдавшие образование узорчатых полых каналов, проводящих жидкость. Каналы, образованные агрессивными клетками увеальной меланомы, архитектурно не являлись сосудами, поскольку в их составе не было эндотелиальных клеток и фибробластов, однако они транспортировали плазму и, возможно, эритроциты. Формирование этих каналов не было ангиогенным событием, поскольку они не возникали из ранее существовавших сосудов, а развивались *de novo*. A.J. Maniotis и соавт. ввели термин «васкулогенная мимикрия» для описания данного явления. Слово «васкулогенная» выбрано потому, что каналы, подобно сосудам, могли проводить плазму и эритроциты. Термин «мимикрия» указывает на то, что эти каналы не являются настоящими кровеносными сосудами, а лишь имитируют их функции.

Васкулогенная мимикрия рассматривается не только в контексте прогрессии опухолей, но и как явление, наблюдаемое в нормальных эмбриональных тканях. Ранее подобные процессы микроциркуляции без участия эндотелиальных клеток выявлены в ходе раннего эмбрионального развития. В этот период фетальные цитотрофобласты демонстрируют поведение, сходное с опухолевыми клетками. Для получения доступа к материнской крови эти клетки проникают в артериолы, формируют связи с материнским эндотелием и замещают его, образуя гибридную сосудистую сеть в матке. При этом инвазивные трофобласты характеризуются эндотелиальным фенотипом, высоко продуцируя рецепторы адгезии, васкулогенные факторы и их рецепторы [5].

У позвоночных эндотелиальные клетки выстилают просвет сердца и всех кровеносных сосудов, тогда как у беспозвоночных они либо отсутствуют, либо не образуют непрерывной сосудистой стенки. Это указывает на то, что наличие эндотелиальных клеток не является эволюционно консервативной особенностью сердечно-сосудистых структур. Например, у европейского ланцетника (*Branchiostoma lanceolatum*) сосуды выстланы внеклеточным матриксом (ЕСМ) в отсутствие эндотелиальных клеток. Обнаружено, что во время развития ланцетника ламининсодержащий ЕСМ заполняет пространство между базальными поверхностями

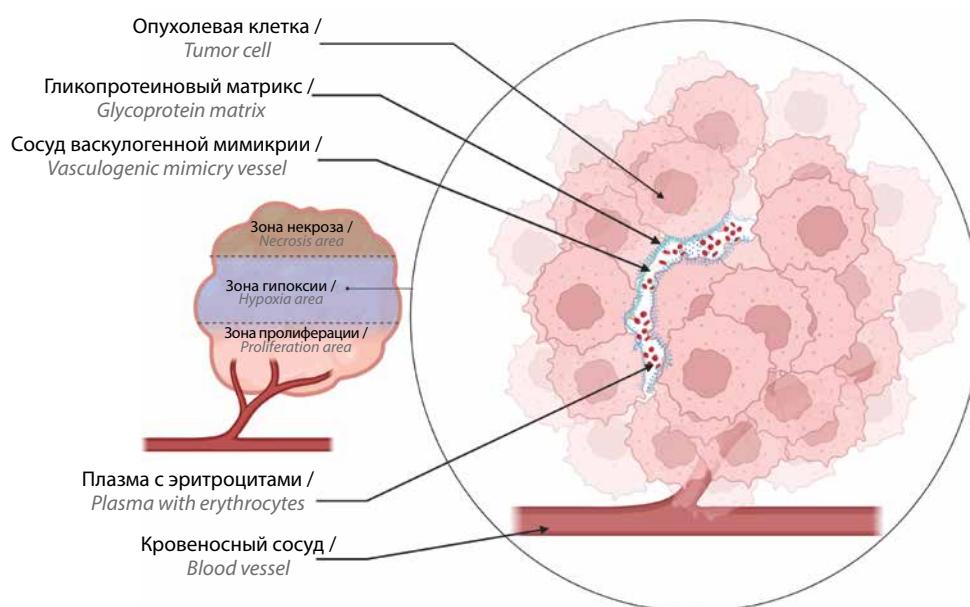


Рис. 1. Формирование опухолевыми клетками васкулогенной мимикрии в условиях гипоксии в толще опухоли

Fig. 1. Tumor cell-driven vasculogenic mimicry formation under hypoxic conditions within the tumor mass

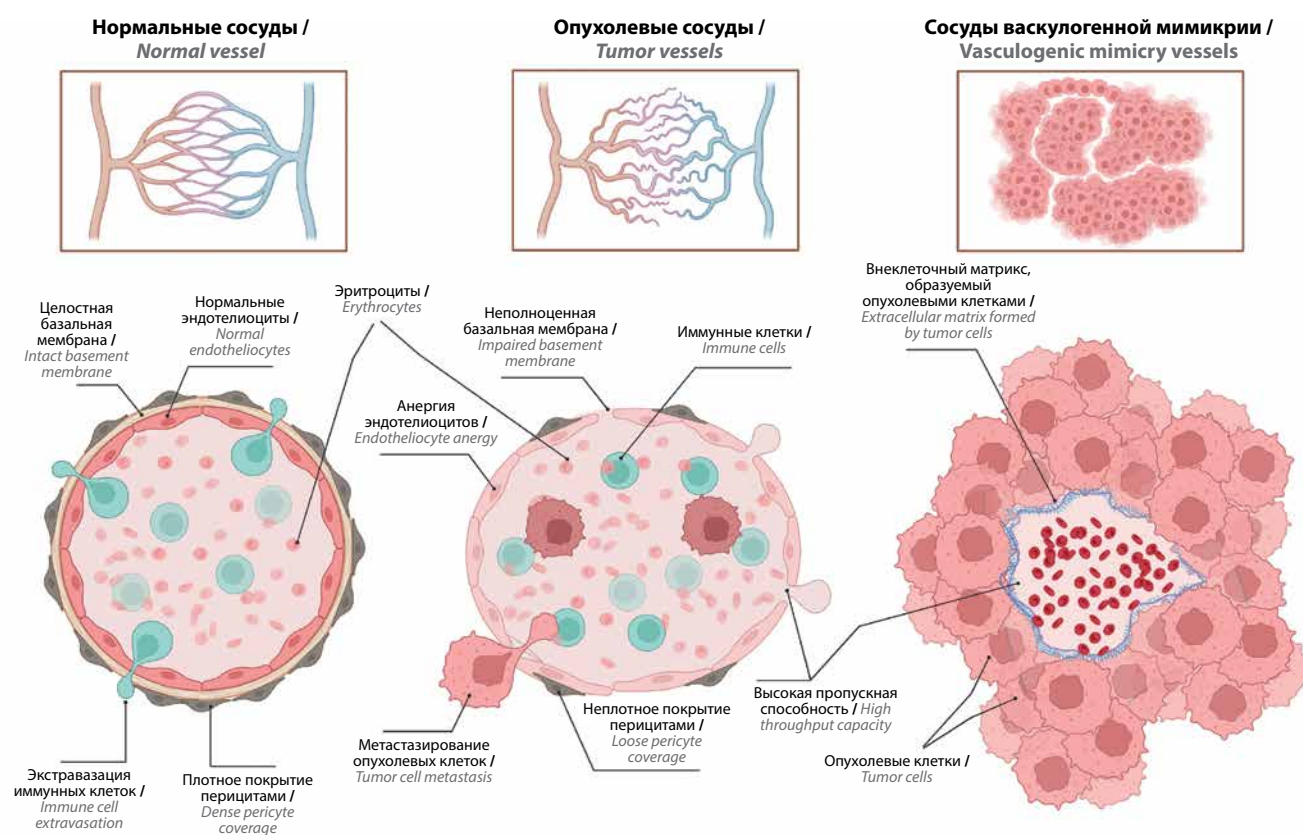


Рис. 2. Различия между нормальными, опухолевыми кровеносными сосудами и структурами васкулогенной мимикрии. В нормальных сосудах внешний слой состоит из перитцитов, которые окружают базальную мембрану, а внутреннюю поверхность выстилают эндотелиальные клетки. В опухолевых сосудах структура напоминает нормальные сосуды, однако перитциты могут отсутствовать или быть в недостаточном количестве, а базальная мембрана становится более тонкой и фрагментированной. В структурах васкулогенной мимикрии эндотелиальные клетки отсутствуют, а опухолевые клетки располагаются на богатом гликопротеиновом матриксе

Fig. 2. The differences between normal blood vessels, tumor vessels formed through angiogenesis, and structures of vasculogenic mimicry. In normal vessels, the outer layer consists of pericytes that surround the basement membrane, while endothelial cells line the inner surface. In tumor vessels, the structure resembles normal vessels; however, pericytes may be absent or present in insufficient numbers, and the basement membrane becomes thinner and more fragmented. In structures of vascular mimicry, endothelial cells are absent, and tumor cells are located on a glycoprotein-rich matrix

клеток эндодермы и мезодермы вдоль их переднезадней оси, а затем появляются клетки крови, которые беспрепятственно передвигаются внутри этого трубчатого пространства [6]. Такие наблюдения не только дают некоторые представления об эволюционном происхождении ВМ, но и демонстрируют, что сосуды без эндотелия не являются исключительной особенностью злокачественных опухолей. Это лишь еще один пример того, как ловко опухолевые клетки способны перенимать древние или ныне существующие физиологические пути.

Ангиогенез и ВМ преследуют общую цель — создание в тканях структур, проводящих жидкость. Однако по структуре они различаются (рис. 2). В нормальных кровеносных сосудах базальная мембрана непрерывно окружает один слой эндотелиоцитов, которые, в свою очередь, выстилают просвет сосуда. При ВМ опухолевые клетки располагаются на поверхности ЕСМ, богатого гликопротеинами, такими как коллаген и ламинин, а также другими компонентами, формирующими структуру, окружающую центральный просвет. Образующиеся сосудоподобные каналы не являются истинными кровеносными сосудами, а лишь имитируют их функцию, тем самым четко определяя феномен ВМ. Зачастую они имеют вид замкнутых петель, окружающих гнезда или дольки, образованные опухолевыми клетками [7]. В целом нормальные кровеносные сосуды и сосуды ВМ можно идентифицировать на основе структурных и фенотипических различий.

Васкулогенная мимикрия в опухолях встречается относительно редко, но ее присутствие связано с повышенным риском метастазирования, что приводит к неблагоприятному клиническому прогнозу [8]. Результаты ряда исследований показали наличие ВМ в глиобластоме [9], плоскоклеточной карциноме головы и шеи [10], колоректальном раке [11], раке молочной железы [12], астроцитоме [13], карциноме яичников [14, 15] и саркоме Юинга [16].

Существование ВМ подтверждено с помощью различных передовых технологий, включая конфокальную лазерную сканирующую ангиографию и электронную микроскопию [17]. Также большую роль в ее исследовании играют тесты *in vitro*, такие как двух- или трехмерное культивирование (сфероиды) в матриксе [4, 7, 17, 18].

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

В ходе первых исследований, направленных на определение ВМ в ксенотрансплантатах клеток рака молочной железы, применялось классическое окрашивание гематоксилином и эозином. Авторы отметили, что при использовании только этого метода патологоанатом может ошибочно интерпретировать ВК как скопление крови, или так называемые кровяные

бассейны, которые возникают в результате внутренних кровоизлияний в опухоли [19].

Общепризнанным стандартом выявления ВМ в опухолевой ткани является дифференциальное иммуногистохимическое окрашивание CD31 и окрашивание Шифф-йодной кислотой (ШИК-реакция, *periodic acid–Schiff*, PAS), представляющие собой наиболее надежные методы, которые позволяют отличить структуры ВМ от эндотелийзависимых опухолевых сосудов. PAS-окрашивание состоит из 2 реакций. Первая реакция заключается в окислении диолов и 1-гидрокси-2-аминовой, 1-гидрокси-2-алкиламиновой и 1-гидрокси-2-кетоновой групп с образованием альдегидов под действием йодной кислоты, вторая — с последующим окрашиванием реактивом Шиффа. Йодная кислота селективно окисляет 1,2-диоли (гликоли), которые являются основными компонентами гликогена, гликопротеинов, гликолипидов и муцинов, расщепляя связь между двумя соседними углеродами и образуя пару альдегидных групп. При этом она предотвращает чрезмерное окисление гидроксильных групп до карбоксильных. Альдегиды могут реагировать с реагентом Шиффа, который представляет собой смесь парарозанилина и метабисульфита натрия, образуя пурпурно-маджентовый цвет. Такая окраска позволяет проводить контрастирование гематоксилином. Итак, с помощью PAS-реакции можно выделить все клеточные структуры, содержащие большое количество углеводов, такие как соединительные ткани и базальные мембраны сосудов.

Первое исследование, в котором использовалась комбинация PAS⁺/CD34⁺, проведено на модели клеток меланомы B16, введенных мышам линии C57Bl/6. Результаты этого пилотного исследования продемонстрировали наличие PAS⁺-сосудоподобных структур с эритроцитами в просвете, не содержащих эндотелиоцитов [20]. Затем в ходе ряда работ были получены убедительные доказательства наличия PAS⁺/CD31⁺-окрашенных структур, которые также содержали тромбоциты и эритроциты в своем просвете [20, 21].

Со временем стало ясно, что существующие методы, используемые для идентификации ВМ *in vivo*, недостаточно информативны. Наличие только PAS⁺-окрашивания не является доказательством присутствия ВМ. Поэтому исследователи направили свои усилия на поиск новых предиктивных маркеров ВМ, таких как наличие мукопротеинов в сосудах, которые не экспрессируют CD31 [22].

За последние два десятилетия выявлены маркеры, которые либо являются общими для эндотелиальных клеток и сосудов ВМ, либо довольно селективны для каждого из этих типов сосудов. В частности, VE-кадгерин, E-селектин и CD34 идентифицированы как маркеры сосудов, полученных из опухолевых клеток ВМ и из нормальных эндотелиальных клеток. Напротив, Tie-2, рецепторы 1 (VEGFR-1) и 2 (VEGFR-2) VEGF, P-селектин, VCAM-1/CD106 и PECAM-1/CD31

селективно идентифицируют эндотелиальные сосуды, в то время как EphA2, Tie-1, фактор роста эндотелия сосудов C (VEGF-C), нейропинин 1, эндоглин, TFPI1 и цепь ламинина $5\gamma 2$ избирательно определяют наличие сосудов BM [23]. Несмотря на широкий спектр маркеров, используемых для выявления BM, во многих исследованиях основным подходом остается комбинация окрашивания $PAS^+/CD31^-$. Этот метод позволяет определить BM и отделить ее от сосудов, сформированных эндотелиальными клетками. Поэтому при $PAS^+/CD31^-$ сосуды считаются структурами BM, тогда как $PAS^+/CD31^+$ указывают на сосуды, образованные эндотелием.

Образование псевдососудов, богатых ламинином, протеогликанами, гепарансульфатом и коллагенами IV и VI типов, визуализируемое при PAS-окрашивании, является важнейшим гистопатологическим доказательством наличия BM в гиперваскулярных опухолях [24].

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ТИПЫ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

В литературе описаны 2 типа BM: тубулярный [9] и классический тип узорчатых матриц [25] (рис. 3).

Тубулярный тип BM может быть неправильно интерпретирован как нормальные кровеносные сосуды, выстланные эндотелием, в то время как узорчатый тип не обладает ни морфологическим, ни топологическим сходством с сосудами. При классическом типе узорчатых матриц BM выявлены матричные белки, включая ламинин, гепарансульфат, протеогликаны, а также коллагены IV и VI типов. Узорчатый матрикс анастомозирует с кровеносными сосудами, перенаправляя поток крови вглубь опухоли. Этот тип BK обнаружен в увеальной меланоме, меланоме кожи и слизистых оболочек, протоковой карциноме молочной железы, карциномах яичников и предстательной железы, а также в саркомах мягких тканей, таких как синовиальная саркома, рабдомиосаркома, остеосаркома и феохромоцитома.

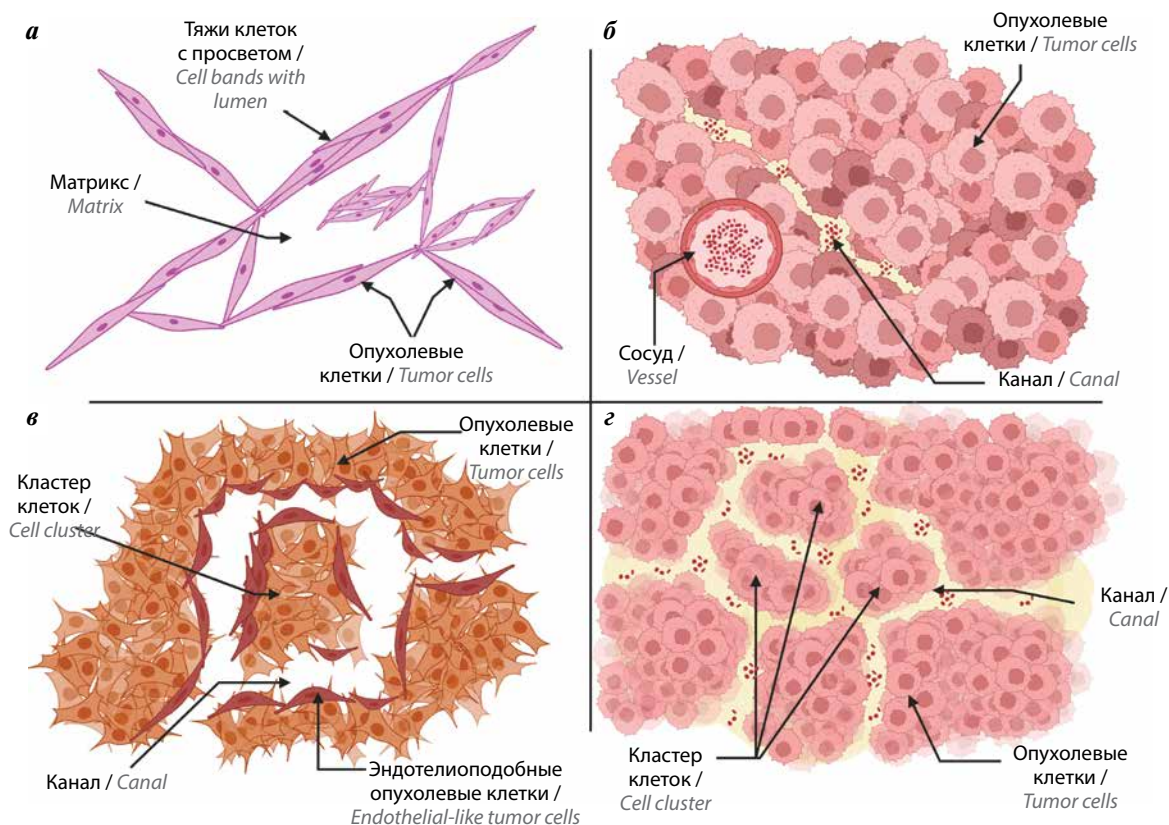


Рис. 3. Различные морфологические формы васкулогенной мимикрии: а — тубулярный тип *in vitro*. Этот тип формируется в результате взаимодействия опухолевых клеток в матриксе, что приводит к формированию взаимосвязанных тяжей, трубчатых образований; б — тубулярный тип *in vivo*. Опухолевые клетки синтезируют обогащенный протеогликанами и ламининами матрикс, который напоминает матричные трубочки; в — классический тип узорчатых матриц *in vitro*. Этот тип характеризуется клеточными кластерами, которые формируют плоские опухолевые клетки, помещенные в матриксель. Клетки опухоли с эндотелиоподобными признаками располагаются вокруг данных кластеров; з — классический тип узорчатых матриц *in vivo*. Несколько слоев внеклеточного матрикса, насыщенного коллагенами IV и VI типов, ламинином и фибронектином, образуют петли, окружающие островки опухолевых клеток

Fig. 3. Various morphological forms of vasculogenic mimicry: a — tubular type *in vitro*. This type is formed as a result of tumor cell interactions in matrigel, leading to the development of interconnected strands or tubular formations; б — tubular type *in vivo*. In this case, tumor cells synthesize a matrix enriched with proteoglycans and laminins, resembling matrix tubes; в — patterned type *in vitro*. This type is characterized by cell clusters formed by flat tumor cells placed in matrigel. Tumor cells with endothelial-like features are arranged around these clusters; з — patterned type *in vivo*. In this type of vasculogenic mimicry, several layers of extracellular matrix, enriched with type IV and VI collagens, laminin, and fibronectin, form loops surrounding islands of tumor cells

Опухолевые клетки, участвующие в формировании структур ВМ, возвращаются к недифференцированному эмбриональному фенотипу и приобретают свойства эндотелиальных клеток. Этот переход к эмбриональному состоянию позволяет им образовывать сосудистые структуры, аналогичные эмбриональным васкулогенным образованиям [26, 27]. Поскольку микроциркуляция в опухолях в ряде случаев неоднородна (наличие инкорпорированных или кооптированных сосудов, ангиогенных, мозаичных сосудов и ВМ тубулярного типа и классического типа узорчатых матриц), терапевтические подходы, направленные исключительно на ангиогенез, могут быть неэффективны против высокоагрессивных опухолей, использующих различные стратегии обеспечения кровоснабжения.

Таким образом, в настоящее время к основным методам выявления ВМ относятся:

- гистохимическое окрашивание — PAS⁺, CD31/34⁻ [4];
- морфологическая идентификация — определение каналов, выстланных опухолевыми клетками, со специфическими депозитами ЕСМ. Каналы могут быть тубулярного типа [9] и классического типа узорчатых матриц [4];
- иммунофенотипическая характеристика — наличие выраженного мультипотентного фенотипа, характерного для стволовых клеток [28];
- физиологическая характеристика — злокачественные клетки, образующие каналы ВМ, обладают высоким инвазивным и метастатическим потенциалами [29].

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ И ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА ФОРМИРОВАНИЕ СОСУДОВ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

Функциональная значимость каналов ВМ определяется их непрерывностью и анастомозом с нормальными сосудами, выстланными эндотелием, а также наличием эритроцитов в их просвете [30]. Однако исключительно ли злокачественные клетки участвуют в формировании псевдососудистого русла при ВМ? Строма опухоли включает множество различных клеток, каждая из которых вносит свой вклад в этот процесс. Она содержит эндотелиоциты, перициты, тромбоциты, опухоль-ассоциированные фибробласты (CAF), опухолевые стволовые клетки (CSC) и опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) [31]. В совокупности эти клеточные популяции создают сложное микроокружение, которое поддерживает образование и функционирование ВМ, тем самым обеспечивая опухоль дополнительными путями кровоснабжения и способствуя ее агрессивному росту и метастазированию (рис. 4). Рассмотрим роль каждой из этих популяций клеток в формировании ВМ.

Опухолевые клетки привлекают макрофаги и перепрограммируют их, превращая в основной источник ангиогенных факторов [32]. TAM являются ключе-

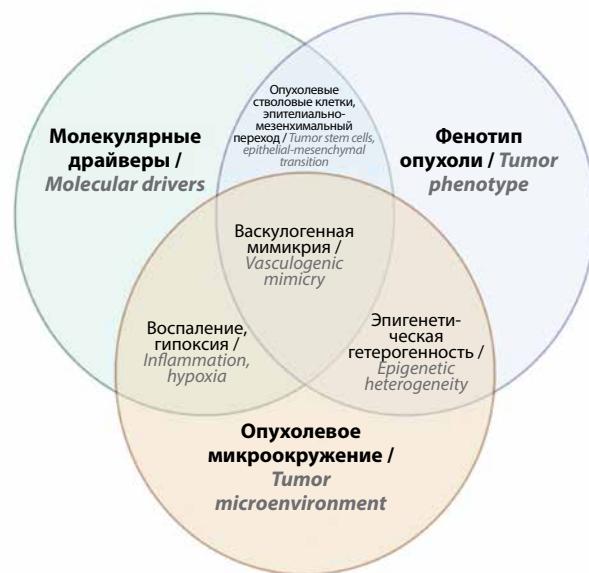


Рис. 4. Молекулярные регуляторы васкулогенной мимикрии. Васкулогенная мимикрия при онкологических заболеваниях активируется несколькими драйверами, связанными с фенотипическими особенностями опухолей, факторами и сигналами микроокружения

Fig. 4. Molecular regulators of vasculogenic mimicry. Vasculogenic mimicry in oncological diseases is activated by multiple drivers linked to the phenotypic characteristics of tumors, as well as microenvironmental factors and signaling pathways

выми эффекторами врожденного иммунного ответа и также выполняют вспомогательные функции в заживлении ран и ангиогенезе благодаря секреции цитокинов и ремоделированию ЕСМ. Однако традиционно считалось, что макрофаги не могут напрямую участвовать в формировании стенок сосудов. Вопреки этому представлению, F.Y. Barnett и соавт. выявили, что макрофаги способны структурно формировать примитивные сосуды ВМ как в нативных опухолях, так и в моделях ангиогенеза *in vivo*, что существенно расширяет наше понимание их функциональных возможностей [33]. Результаты исследования этих авторов продемонстрировали, что каналы, формируемые TAM, связаны с сосудистой системой. В образцах опухолей человека F.Y. Barnett и соавт. обнаружили сети CD163⁺-макрофагов, которые совпадали с PAS⁺-областями, характерными для ВМ. Согласно данным, полученным в ходе исследования, макрофаги способны экспрессировать маркеры CSC, такие как CD34, CD44 и CD133, что указывает на их потенциальную роль в поддержании стволовости и пластичности опухолевых клеток [33].

Для подтверждения роли макрофагов в формировании каналов внутри опухолей F.Y. Barnett и соавт. провели исследования на двух моделях меланомы. Сначала они проверили, что используемые клеточные линии меланомы не экспрессировали маркеры макрофагов CD11b или F4/80 *in vitro*. Затем клетки меланомы мыши B16/F10 и человека A375 были введены подкожно мышам C57BL/6J и бестимусным мышам

соответственно. В обеих моделях опухолей клетки, экспрессирующие маркеры макрофагов (CD11b, CD163 и F4/80), формировали сеть взаимосвязанных клеток в строме опухоли, что указывает на участие макрофагов в образовании структур BM. Эти сети также окрашивались эндотелиальными маркерами CD31 и лимфатическим маркером LYVE1. Чтобы проверить связь макрофагальных сетей с сосудистой системой, перед эвтаназией и эксплантацией опухолей исследователи ввели мышам через хвостовую вену флуоресцентный краситель декстран-родамин. Сеть опухолевых макрофагов заполнялась внутривенно введенным красителем, причем 61% перфузированного декстрана определялся на поверхности CD11b⁺-клеток и только 33 % — на поверхности CD31⁺-клеток. Эти данные подтверждают, что макрофаги участвуют в формировании каналов, связанных с сосудистой системой опухолей [33], и не только играют роль в ремоделировании ECM, но и могут образовывать примитивные сосудистые структуры в условиях опухолевого микроокружения, внося вклад в возникновение BM.

Перепрограммированные TAM могут выделять большое количество ангиогенных факторов, таких как VEGF, который способствует формированию новых кровеносных сосудов. Они также секретируют матриксные металлопротеиназы (MMP), разрушающие ECM, способствуя ремоделированию тканей и образованию новых сосудов, необходимых для роста опухоли. Более того, TAM могут выделять провоспалительные цитокины, такие как TNF- α и интерлейкин 6 (IL-6), которые усиливают воспаление и стимулируют пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, обуславливая возникновение BM и метастазирования. Таким образом, TAM не только поддерживают ангиогенез, но и играют большую роль в создании микроокружения, благоприятного для опухолевого роста и метастазирования. Структурное участие макрофагов в сосудистой мимикрии, вызванной гипоксией, может представлять новые терапевтические мишени для разработки лекарств и методов лечения.

Также в формировании BM большую роль играют CAF. Эти клетки способны выделять факторы роста опухоли, необходимые для васкуляризации через различные сигнальные пути в злокачественных опухолях, и участвуют в создании BM [34]. CAF происходят из местных фибробластов, прогениторных клеток, полученных из костного мозга, или являются продуктом трансдифференцировки эпителиальных и эндотелиальных клеток посредством, например, эпигенетических изменений [35]. Благодаря приобретенному секреторному фенотипу они играют главную роль в таких процессах, как EMT, ангиогенез и привлечение иммунных клеток. CAF секретируют TGF- β 1 и, таким образом, индуцируют EMT во многих карциномах. TGF β 1-опосредованная потеря адгезивных контактов увеличивает подвижность опухолевых клеток, что усиливает инвазию и метастазирование [36]. CAF опухолевой стромы

способствуют повышению внутриопухолевого интерстициального давления благодаря их способности сокращаться и оказывать давление на ECM, тем самым сжимая интерстициальное пространство. В конечном счете это приводит к снижению антиангиогенной терапевтической эффективности и образованию сосудов BM [37].

Результаты исследования J. Hutchenreuther и соавт. дают новое представление о перекрестном взаимодействии различных типов клеток в микроокружении опухоли и позволяют предположить, что CAF играют большую роль (которая ранее была недооценена) в процессе неоваскуляризации опухоли, опосредованной продукцией CCN2 (connective tissue growth factor). Авторы изучили сингенетическую модель метастазирования меланомы с использованием мышей C57BL/6 с нокаутом CCN2 в CAF и клеток мышинной меланомы B16-F10, чтобы выяснить, требуется ли экспрессия CCN2 в фибробластах для васкуляризации опухоли. Потеря CCN2 привела к снижению активации CAF и индуцированной опухолью неоваскуляризации, включая ухудшение BM и снижение экспрессии проангиогенных белков. Далее была исследована связь между экспрессией CCN2 и клиническими исходами в 46 образцах первичной меланомы пациентов. Обнаружено, что повышенная экспрессия CCN2 ассоциирована с неблагоприятным клиническим прогнозом и выраженной отрицательной корреляцией с выживаемостью без прогрессирования ($p < 0,06$) [34].

Васкуляризация опухоли, опосредованная CAF и CCN2, является важным, но не единственным механизмом, обеспечивающим выживание и прогрессию опухоли. Не менее значимую роль в этом процессе играют CSC, которые, согласно определению Американского онкологического общества (American Cancer Society), представляют собой особый тип клеток, способных к самообновлению и многократной дифференцировке. Несмотря на то что CSC составляют лишь небольшую долю общей массы опухоли, они играют ключевую роль в ее росте, устойчивости к терапии и развитии рецидивов, поддерживая гетерогенность опухоли и ее прогрессию.

Результаты недавних исследований показали, что CSC и эпителиально-эндотелиальный переход, который является подтипом EMT, способствуют ускоренному формированию BM. Они активизируют пластичность опухолевых клеток, ремоделируют ECM и соединяют структуры BM с кровеносными сосудами.

M. Bittner и соавт., а также Е.А. Seftor и соавт. проанализировали дифференциально экспрессированные гены в высокоагрессивных и неагрессивных меланомах и выявили множество фенотипспецифических генов, характерных для клеток сосудов BM [38, 39]. В агрессивных меланомах, помимо генов, специфичных для клеток меланомы, обнаружены также гены, присущие эндотелиальным, эпителиальным, мышечным, почечным клеткам, различным типам клеток-предшественников, фибробластам и клеткам кроветворения [38, 40].

В. Sun и соавт. исследовали структуру кровеносных сосудов у 169 пациенток с раком молочной железы и обнаружили, что в группе трижды негативного рака молочной железы было больше ВМ-положительных образцов, чем в группе люминального или HER2-положительного рака молочной железы (HER2 — рецептор эпидермального фактора роста 2) [41]. Результаты анализа профилей экспрессии генов у 587 пациенток с трижды негативным раком молочной железы продемонстрировали наличие специфичных маркеров стволовых клеток, например маркеров, характерных для мезенхимальных стволовых клеток, таких как эндоглин, BMP2, ITGAV, Thy-1 (CD90) и VCAM1. Также обнаружены ABCA8, ABCB1, PROCR, ALDH1, циркадный ген *PER1* [41].

Внеклеточный матрикс является важным структурным элементом опухолевых клеток. Он может изменяться под воздействием клеточных процессов и, в свою очередь, оказывать влияние на клеточную активность. Состав ECM регулирует приобретение фенотипа ВМ в CSC. При ранней опухолевой прогрессии CSC могут выделять большое количество ангиопоэтиновых факторов, таких как IGFBP1/2/3, MCP1, IL-8, эпидермальный фактор роста (EGF) и VEGF, которые стимулируют рост и самообновление CSC, запуская процесс ВМ. Разнообразные структуры коллагена в ECM оказывают влияние на поведение опухолевых клеток, связанное с васкулогенезом, а различные молекулы ECM, такие как COL4A1, JAG1 и THBS1, могут способствовать развитию ВМ [42].

Таким образом, гетерогенность опухолевого микроокружения, ECM и агрессивность физиологических условий способствуют формированию ВМ, ускоряя пластичность опухолевых клеток, ремоделируя архитектуру опухоли и способствуя соединению каналов ВМ с кровеносными сосудами организма. Такая неравномерная архитектура опухолевого сосудистого русла в сочетании с неравномерным направлением потока, турбулентностью и повышенным давлением делает сосудистое русло опухоли негерметичным, что затрудняет доставку терапевтических препаратов, вводимых через кровоток, к месту их действия.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ: ПЕРСПЕКТИВЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Помимо разногласий относительно природы, определения и идентификации сосудистых структур ВМ, исследователи стремятся определить молекулярные механизмы этого процесса (рис. 5). Мультипотентный фенотип, лежащий в основе ВМ, поддерживается сложным взаимодействием сигнальных путей, которые обычно ограничены развитием или клеточной спецификой. В частности, ключевые гены, модулирующие ВМ, можно разделить на пути, связанные с сосудистой сигнализацией, эмбриональными и/или стволовыми клетками, а также гипоксией (табл. 1).

В большинстве исследований для выявления ВМ используется двойное окрашивание PAS⁺/CD31⁻ или PAS⁺/CD34⁻. В случае образцов с подтвержденной

Таблица 1. Молекулярные факторы и пути, вовлеченные в формирование васкулогенной мимикрии опухолевыми клетками

Table 1. Molecular factors and pathways involved in the formation of vasculogenic mimicry by tumor cells

Молекулярный маркер/ сигнальный путь Molecular marker/signal pathway	Тип злокачественного новообразования Type of malignant neoplasm	Источник Source
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Мелкоклеточный рак легкого, меланома кожи, карцинома шейки матки, колоректальный рак, рак яичников Small cell lung cancer, skin melanoma, cervical carcinoma, colorectal cancer, ovarian cancer	[2, 45, 46–48]
Кадгерин сосудистого эндотелия (VE-кадгерин) Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)	Мелкоклеточный рак легкого, меланома кожи, остеосаркома, трижды негативный рак молочной железы, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак пищевода Small cell lung cancer, skin melanoma, osteosarcoma, triple-negative breast cancer, prostate cancer, esophageal squamous cell carcinoma	[23, 26, 27, 48–54]
Рецептор 2 эфрина типа А (EphA2) Ephrin type-A receptor 2 (EphA2)	Меланома кожи, карцинома желчного пузыря, рак предстательной железы Skin melanoma, gallbladder carcinoma, prostate cancer	[44, 53, 55–57]
Матриксные металлопротеиназы (MMP) Matrix metalloproteinases (MMP)	Крупноклеточный рак легкого, меланома кожи, остеосаркома, печеночно-клеточная карцинома Large cell lung cancer, skin melanoma, osteosarcoma, hepatocellular carcinoma	[50, 55, 58–63]
Сигнальный путь PI3K/АКТ/ mTOR PI3K/AKT/mTOR pathway	Карцинома желчного пузыря, меланома кожи, печеночно-клеточная карцинома Gallbladder carcinoma, skin melanoma, hepatocellular carcinoma	[44, 58, 62, 64]

Окончание табл. 1

End of table 1

Молекулярный маркер/ сигнальный путь Molecular marker/signal pathway	Тип злокачественного новообразования Type of malignant neoplasm	Источник Source
Фактор, индуцируемый гипоксией 1- α (HIF-1 α) Hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α)	Аденокарцинома легкого, карцинома желчного пузыря, аденокарцинома желудка, печеночно-клеточная карцинома, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак пищевода Lung adenocarcinoma, gallbladder carcinoma, gastric adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, non-small cell lung cancer, esophageal squamous cell carcinoma	[51, 65–71]
Сигнальный путь Notch-Nodal Notch-Nodal signaling pathway	Немелкоклеточный рак легкого, меланома кожи, рак молочной железы, аденокарцинома желудка Non-small cell lung cancer, skin melanoma, breast cancer, gastric adenocarcinoma	72–78]
STAT3	Колоректальный рак, аденокарцинома желудка Colorectal cancer, gastric adenocarcinoma	[67, 79, 80]
Twist1	Печеночно-клеточная карцинома Hepatocellular carcinoma	[52, 80]
DDAH1/ADMA/NO	Трижды негативный рак молочной железы Triple-negative breast cancer	[81]

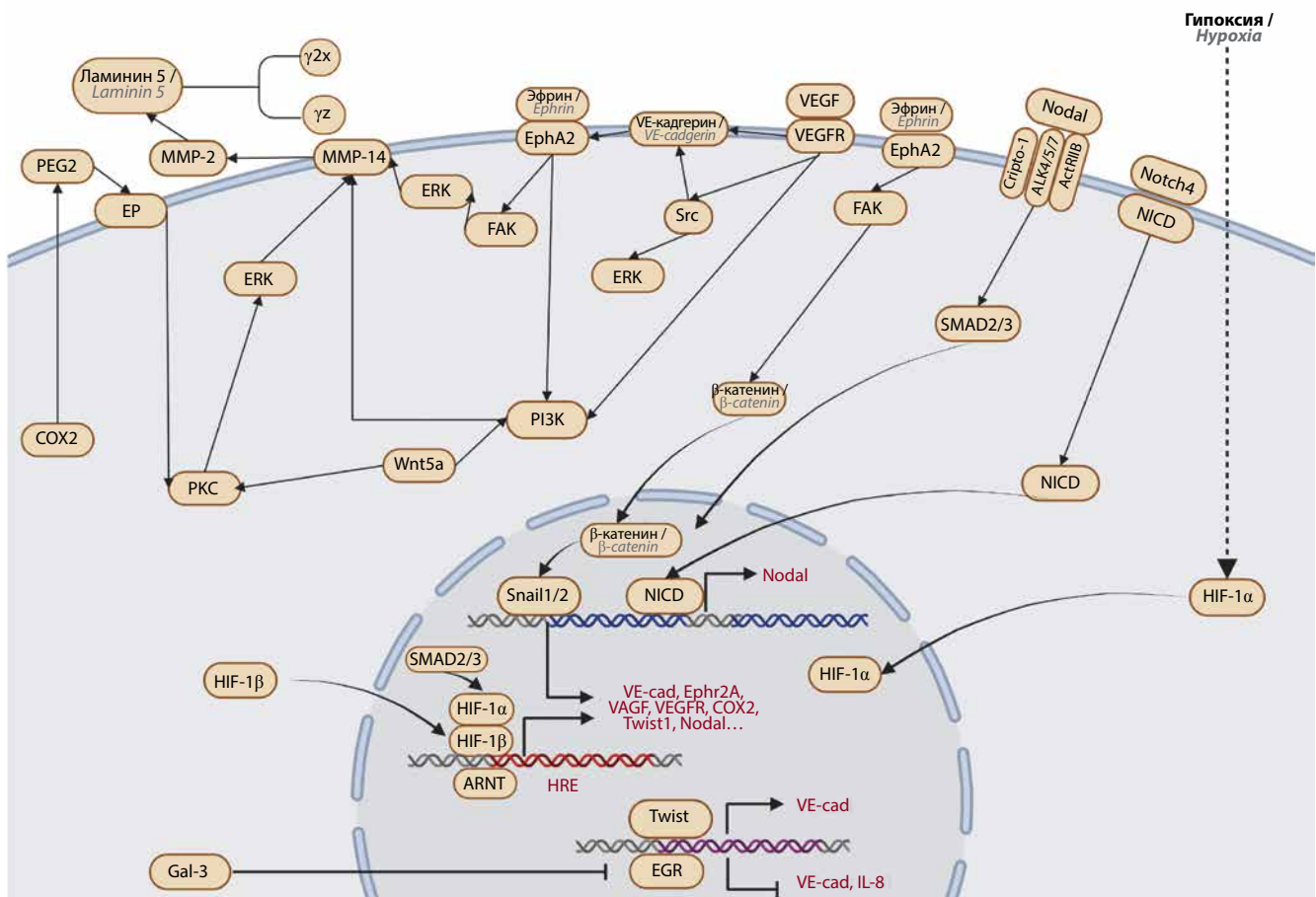


Рис. 5. Молекулярные пути, вовлеченные в формирование васкулогенной мимикрии. MMP-2 – матриксная металлопротеиназа 2; MMP-14 – матриксная металлопротеиназа 14; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов; HIF-1 α – фактор, индуцируемый гипоксией 1- α ; HIF-1 β – фактор, индуцируемый гипоксией 1- β ; IL- β – интерлейкин β ; FAK – киназа фокальной адгезии

Fig. 5. Molecular pathways involved in the formation of vasculogenic mimicry. MMP-2 – matrix metalloproteinase 2; MMP-14 – matrix metalloproteinase 14; PI3K – phosphoinositide-3-kinase; VEGF – vascular endothelial growth factor; VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor; HIF-1 α – hypoxia-induced factor 1- α ; HIF-1 β – hypoxia-induced factor 1- β ; IL- β – interleukin β ; FAK – kinase focal adhesion

ВМ проводится морфологическая идентификация полых структур, которые затем соотносятся с различными молекулярными маркерами [43, 44].

A. Valdivia и соавт., используя критерии для истинных структур ВМ (PAS⁺/CD31⁻ или PAS⁺/CD34⁻ и наличие просвета) для исследований *in vivo* и *in vitro*, отобрали 93 статьи, соответствующие им, и предложили механизм ВМ на основе молекулярных путей [47]. Авторы обнаружили, что сигнальные пути ВМ могут быть разделены на 4 группы:

- молекулярный путь PI3K-АКТ;
- MMP и компоненты ЕСМ;
- сигнальные пути ангиогенеза;
- другие сигнальные пути.

РОЛЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

Матриксные металлопротеиназы — семейство цинкзависимых эндопептидаз, ремоделирующих ЕСМ. Ремоделирование ЕСМ имеет большое значение, поскольку оно связано с эмбриональным развитием, ангиогенезом, восстановлением и обновлением тканей [82]. MMP также играют ключевую роль в инвазии опухоли, метастазировании и формировании ВМ. Они считаются основными протеолитическими ферментами в этом процессе. Экспрессия высокого уровня MMP является одной из важнейших предпосылок образования ВМ.

Злокачественные клетки экспрессируют высокий уровень различных типов MMP, а также 5γ2-цепи ламинина, способствующие формированию ВМ. Результаты исследования E.A. Seftor и соавт. продемонстрировали, что эти компоненты колокализировались с развивающимися узорчатыми сетями, а таргетное воздействие с помощью антител против MMP-2 или MT1-MMP (MMP-14) ингибировало формирование этих сетей [61].

N. Sharma и соавт. протестировали клеточные линии рака предстательной железы крысы Даннинга (Dunning rat prostate tumor R3327) и человека, состоящие из эпителиальных (DU-145) и фибробластических (HMEC-1) субпопуляций, для определения способности экспрессировать эндотелий-ассоциированные гены, включая ламинин и α6/β1-ламининсвязывающий интегрин. Целью исследования было оценить потенциал формирования трубчатых сетей в трехмерных культурах. В ходе работы также сделано морфологическое описание трубчатых каналов и определена их способность проводить жидкости. Мечение зеленым флуоресцентным белком простатических клональных субпопуляций позволило выявить уникальное кооперативное взаимодействие эпителиальных и фибробластических опухолевых клеток в процессе формирования перфузируемых васкулогенных сетей. Хотя данные клеточные линии экспрессировали различные сосудистые маркеры, сформированные ими каналы были также

обнаружены *in vivo* и в некоторых случаях располагались в непосредственной близости от обычных сосудов, выстланных эндотелием [83].

A.K. Sood и соавт. обнаружили связь между ВМ и экспрессией MMP-1, -2, -9 и -14 в образцах рака яичников. Полученные результаты показали, что клетки инвазивного рака яичников способны формировать узорчатые сети с образованием сплошных и полых матричных каналов при выращивании в трехмерных культурах, даже в отсутствие эндотелиальных клеток или фибробластов. Напротив, нормальные эпителиоциты не смогли образовать подобные каналы. Результаты иммуногистохимического анализа продемонстрировали дискретную локализацию MMP в этих сетях, а обработка ингибиторами MMP привела к подавлению их формирования [63]. A.K. Sood и соавт. сообщили о связи между формированием ВМ и экспрессией ламинина 5.

Y. Li и соавт. изучили механизмы, определяющие формирование васкулогенных структур в крупноклеточном раке легкого. В ходе своего исследования они обнаружили, что фрагменты ламинина 5, разрушенные MMP-2, способствуют образованию трубчатых структур клеточными линиями H460 и H661 в трехмерных культурах. Однако транзитная апрегуляция MMP-13 и обработка рекомбинантным белком MMP-13 препятствовали формированию трубчатых структур клетками H460 в 3D-культуре. Обработка клеток фрагментами ламинина 5, разрушенными MMP-2, стимулировала экспрессию EGFR и F-актина, в то время как фрагменты ламинина 5, разрушенные MMP-13, снижали экспрессию EGFR/F-актина и нарушали формирование васкулогенных структур. Исследователи сделали вывод, что экспрессия MMP-13 отрицательно коррелирует с формированием васкулогенных структур, а MMP-2, напротив, способствует образованию трубок в тканях и ксенотрансплантатах крупноклеточного рака легкого [59].

УЧАСТИЕ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ PI3K/АКТ/MTOR В ФОРМИРОВАНИИ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

Сигнальный путь PI3K (фосфоинозитид-3-киназа)/АКТ/mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) является важнейшим внутриклеточным механизмом, участвующим в регуляции клеточной выживаемости, роста, дифференцировки, метаболизма и перестройки цитоскелета в ответ на внешние стимулы. Эти стимулы включают активацию рецепторных тирозинкиназ (RTK), факторов роста и рецепторов, связанных с G-белками. Гиперактивация сигнального каскада PI3K является одним из наиболее частых явлений, наблюдаемых в опухолях человека. Высокая частота встречаемости изменений PI3K-пути при злокачественных новообразованиях привела к резкому увеличению числа ингибиторов PI3K, а также определению его значимости в других областях фундаментальной онкологии [84].

В исследовании A.R. Hess и соавт. впервые показано участие сигнального пути PI3K-АКТ в ВМ. Впоследствии эти авторы представили доказательства роли киназы фокальной адгезии (ФАК) — восходящего компонента пути PI3K и важной составляющей сигнального пути интегринов. Результаты двух связанных исследований показали, что сигнальные пути интегринов, ФАК и PI3K-АКТ также вовлечены в процесс ВМ [58, 64].

В своем первом исследовании A.R. Hess и соавт. изучили ключевые молекулярные механизмы, лежащие в основе ВМ в агрессивных кожных и увеальных меланомах человека. Полученные данные свидетельствуют о том, что PI3K является важным регулятором ВМ и специфически влияет на активность MT1-MMP и MMP-2, критически важных для формирования васкулогенных сетей. С помощью специфических ингибиторов PI3K исследователям удалось подавить ВМ меланомы, что сопровождалось снижением активности MMP-2 и MT1-MMP. Кроме того, ингибирование PI3K блокировало расщепление 5γ2-цепи ламинина, что привело к снижению уровней фрагментов γ2' и γ2х. В совокупности полученные данные указывают на то, что PI3K является важным регулятором ВМ меланомы, непосредственно влияющим на кооперативные взаимодействия MMP-2, MT1-MMP и 5γ2-цепи ламинина, ремоделируя микроокружение опухолевых клеток. PI3K может представлять собой отличную мишень сигнального каскада, лежащего в основе ВМ [58].

Во втором исследовании A.R. Hess и соавт. сконцентрировали свое внимание на ФАК — цитоплазматической тирозинкиназе, необходимой для многих клеточных процессов, включая выживание, инвазию и миграцию клеток. Авторы обнаружили, что ФАК фосфорилирована по ключевым тирозиновым остаткам Tyr397 и Tyr576 только в агрессивных клетках увеальной и кожной меланом, что коррелирует с их повышенной инвазией, миграцией и пластичностью ВМ. В ходе изучения функциональной роли ФАК в агрессивной меланоме выявлено, что нарушение путей передачи сигнала, опосредованных ФАК путем экспрессии некиназы, связанной с ней (FRNK), приводит к снижению инвазии, миграции и ингибированию ВМ клеток меланомы [64].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ АНГИОГЕНЕЗА И ИХ СВЯЗЬ С ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИЕЙ

Результатом как ВМ, так и ангиогенеза является образование трубчатых структур, проводящих жидкость, поэтому логично предположить, что у них есть общие сигнальные пути. К сосудисто-ассоциированным генам, вовлеченным в ВМ, относится VE-кадгерин — гликопротеин, принадлежащий к семейству кадгеринов, который образует трансмембранные структуры и обеспечивает гомотипические взаимодействия между клетками. Он считается специфичным для сосудистого эндотелия и играет решающую роль в васкулогенных процессах.

Примечательно, что VE-кадгерин обнаруживают не только в агрессивных, но и в неагрессивных клетках меланомы, и его подавление приводит к блокировке ВМ [85]. Этот гликопротеин влияет на активность EphA2, способствуя его фосфорилированию при взаимодействии с лигандом эфрина A1 (Ephrin-A1), связанным с мембраной [56, 85].

Фосфорилированный EphA2 впоследствии активирует PI3K, повышает экспрессию MMP-14 и активирует MMP-2. Как MMP-14, так и MMP-2 способствуют расщеплению 5γ2-цепи ламинина на промигрирующие фрагменты γ2' и γ2х, которые, в свою очередь, стимулируют миграцию, инвазию и ВМ в клетках меланомы [61]. Кроме того, экспрессия и активность VE-кадгерина усиливаются при связывании его промотора с транскрипционным фактором Twist1, а снижение экспрессии Twist1 приводит к уменьшению экспрессии VE-кадгерина, MMP-2 и MMP-9 и формированию ВМ в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека [80]. B. Sun и соавт. в своей работе использовали эту карциному в качестве модели для изучения роли Twist1 в процессе формирования ВМ. Они обнаружили, что Twist1 сверхэкспрессируется в образцах опухолей и клеточных линиях гепатоцеллюлярной карциномы человека, причем данный фактор часто присутствует в ВМ-положительных образцах (в 72% случаев). Результаты анализа клинических и патологоанатомических данных показали, что наличие ядерной экспрессии Twist1 и ВМ ассоциировано с более низкими показателями выживаемости пациентов по сравнению с теми, у кого эта экспрессия отсутствует. Исследователи выявили, что повышенная экспрессия Twist1 значительно усиливает подвижность клеток, их инвазивные свойства и формирование ВМ в клетках HepG2. Напротив, снижение экспрессии Twist1 существенно уменьшает миграцию, инвазивность и способность к образованию ВМ в клетках Bel7402 [80].

Одним из наиболее хорошо охарактеризованных ангиогенных факторов, участвующих как в физиологическом, так и в патологическом образовании кровеносных сосудов, является VEGF-A — представитель семейства 5 ангиогенных факторов роста, который играет важнейшую роль в опухолевом ангиогенезе, рекрутируя и стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток в аваскулярных областях быстрорастущих опухолей [86].

Установлено, что этот фактор имеет большое значение в опухолевом ангиогенезе и потенциально может участвовать в формировании ВМ. VEGF-A способен секретироваться опухолевыми клетками и фибробластами и является мощным эндотелийспецифическим митогеном [87]. Действительно, результаты ряда исследований демонстрируют, что ВМ является ключевым процессом, который позволяет опухоли поддерживать собственное кровоснабжение и расти даже в присутствии антиангиогенной терапии. Данные, полученные J.Y. Wang и соавт., показывают пластичность

агрессивных клеток карциномы яичников человека и ставят под сомнение фундаментальное значение их способности формировать ВМ *in vitro* под действием VEGF-A. Исследователи установили, что путь VEGF-A/EphA2/MMP является основным путем формирования ВМ, и VEGF-A играет большую роль не напрямую, а опосредованно. Результаты были получены с помощью тестов *in vitro*, проведенных на 3D-культурах и клинических образцах, для которых проведено иммуногистохимическое исследование. По мнению авторов, стратегии воздействия на ВМ при раке яичников включают анти-VEGF-A-терапию, нокаут гена EphA2 и использование антител против человеческих MMP, если опухоль является ВМ-положительной. Эта стратегия может иметь большое значение для разработки эффективной терапии против ангиогенеза в опухоли [88].

VEGFR1 и VEGFR2 связывают VEGF-A аутокринным или паракринным образом и проявляют различные сигнальные способности. VEGFR1 опосредует VEGF-A-индуцированную ВМ в клетках меланомы, поэтому сделано предположение, что ВМ опосредуется через синергетическую трансдукцию VEGF-A/VEGFR1/PI3K/PKCα и интегриновых сигнальных путей [89].

N.Y. Frank и соавт. обнаружили субпопуляцию клеток меланомы, известных как ABCB5⁺-опухоль-инициирующие клетки, которые в значительной степени экспрессируют VEGFR1. Они также выявили, что сигнализация, опосредованная VEGFR1, имеет ключевое значение для ВМ, производства ламинина и ускоренного роста опухоли [90].

Многие исследователи сообщают, что сигнальные пути ангиогенеза играют определенную роль в ВМ, при этом отмечается корреляция между наличием ВМ и экспрессией VEGF или PDGFRβ в опухолевой ткани [40].

Взаимосвязь ВМ и ангиогенеза остается предметом споров. VEGF может опосредованно влиять на процессы ВМ, однако некоторые исследователи указывают на то, что антиангиогенная терапия, в том числе с использованием ингибиторов VEGF или его рецепторов, не оказывает значительного влияния на ВМ [91, 92]. Очевидно, что отсутствие консенсуса по критериям для описания ВМ может объяснить, почему роль проангиогенных факторов в образовании ВМ остается неясной.

РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

Сигнальный путь Nodal-Notch является важным регулятором эмбриональной плюрипотентности человека и эмбрионального развития позвоночных [93]. Nodal — это фактор роста из суперсемейства TGF-β, который связывает Cripto-1 и активирует рецепторы активиноподобной киназы I и II типов (ALK4/5/7

и ActRIIB соответственно), которые впоследствии распространяют каноническую сигнализацию через Smad2/3. Показано, что этот эмбриональный путь играет большую роль в опухолевой прогрессии и агрессивном поведении опухолевых клеток, включая ВМ [73, 94]. Воздействие на клетки агрессивной меланомы антителом против Nodal, блокирующим их функции, приводит к снижению способности этих клеток участвовать в ВМ. Это свидетельствует о том, что Nodal является важным регулятором пластичности опухолевых клеток и их перехода в эндотелиальноподобный фенотип, характерный для ВМ [73, 74].

Результаты исследования W. Gong и соавт. продемонстрировали, что гиперэкспрессия Nodal способствует формированию ВМ клетками рака молочной железы *in vitro* и *in vivo*, тогда как нокаут экспрессии Nodal сдерживает формирование ВМ. Кроме того, Nodal индуцировал EMT и повышал экспрессию Slug, Snail и c-Myc. Исследователи обнаружили, что блокирование пути Smad2/3 с помощью введения ингибитора SB431542 подавляет формирование ВМ в клеточных линиях и ксенотрансплантатах рака молочной железы. В целом Nodal-сигнализация через путь Smad2/3 повышает регуляцию Slug, Snail и c-Myc, вызывая EMT и способствуя тем самым формированию ВМ. Результаты исследования W. Gong и соавт. позволяют предположить, что сигнальный путь Nodal может служить терапевтической мишенью для ингибирования формирования ВМ и улучшения прогноза у больных раком молочной железы [76].

Подобно Nodal, Notch необходим для эмбрионального развития. Известно, что 4 трансмембранных рецептора Notch, связанных с 5 лигандами, играют большую роль в процессе эмбриогенеза позвоночных. Данные, полученные L. Strizzi и соавт., указывают на молекулярное взаимодействие Nodal и Notch. Сигнализация Nodal инициируется через серию протеолитических расщеплений, в результате которых высвобождается внутриклеточный домен Notch — NICD. Затем NICD транслоцируется в ядро, активируя транскрипцию Nodal [74]. В соответствии с этим совместная экспрессия Nodal и Notch4 необходима для пролиферации и выживания опухолевых клеток. Результаты исследования, полученные L. Strizzi и соавт., продемонстрировали, что подавление Notch4 приводит к снижению уровней VE-кадгерина и блокирует васкулогенез, зависящий от Nodal. Это подчеркивает возможную ключевую роль сигнального пути Notch4-Nodal в образовании васкулогенных сетей [75]. Кроме того, недавно полученные данные указывают на то, что в гепатоцеллюлярной карциноме экспрессия Notch1 коррелирует с ВМ через механизм EMT, а в случае рака желудка — с увеличением секреции VEGF [77, 95]. К тому же блокирование Notch3 снижает как опухолевый рост, так и ВМ в стволовых клетках меланомы, что демонстрирует большую роль Notch3 в ангиогенезе опухолей [77, 78].

РОЛЬ ФАКТОРОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ ГИПОКСИЕЙ, В ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

Гипоксия, характеризующаяся недостаточным уровнем кислорода, является общим признаком большинства опухолей. При прогрессии опухоли локальная гипоксия различной степени может стимулировать агрессивное поведение, инвазию и метастазирование злокачественных клеток, а также способствовать развитию ангиогенеза, ЕМТ, нестабильности генома, устойчивости к апоптозу и поддерживать и увеличивать количество CSC [96, 97].

Гипоксия участвует в формировании ВМ через несколько сигнальных путей и является наиболее мощным фактором, влияющим на образование псевдососудов. Снижение уровня кислорода подавляет деградацию HIF-1 α и HIF-2 α , что способствует их стабилизации. Это позволяет им мигрировать в ядро, где они связываются с элементами ответа на гипоксию (hypoxia response elements, HRE) в промоторах и энхансерах эффекторных генов [98].

Под элементами ответа на гипоксию подразумевается множество факторов, такие как VEGF, VEGFR, EphA2, Twist, COX-2 и Nodal, индукторы ЕМТ и гены, ассоциированные со стволовыми клетками [96, 99].

Показано, что гипоксия индуцирует ВМ в карциноме молочной железы [100], гепатоцеллюлярной карциноме [101], саркоме Юинга [16] и меланоме [102].

В искусственно созданных гипоксических условиях, вызванных пережатием бедренной артерии у мыши, образование каналов ВМ в трансплантатах меланомы ускорилось [103].

Результаты исследования D.F. Quail и соавт. показали, что гипоксия может как напрямую воздействовать посредством связывания HIF-1 α /HRE на экспрессию генов VEGF-A, VEGFR, Twist, Nodal, EphA2 и COX-2, так и косвенно влиять на уровень VE-кадгерина и тканевого фактора (tissue factor, TF) через активацию белков-посредников. Гипоксия также способна изменять экспрессию генов, реагирующих на Notch, в частности, она стабилизирует белок NICD (Notch intracellular domain), который взаимодействует с HIF-1 α и активирует гены с промоторами, чувствительными к Notch, включая Nodal [104]. Считается, что это неклассическое взаимодействие между путями HIF-1 α и Notch способствует развитию недифференцированных клеточных состояний, что дополнительно подчеркивает потенциальные механизмы пластичности опухолевых клеток, связанные с ВМ.

Таким образом, гипоксия стимулирует опухоль к созданию ВМ, что помогает ей обойти недостаток кислорода и ресурсов в окружающей ткани. Этот процесс является одним из ключевых механизмов адаптации опухоли к условиям гипоксии и содействует ее прогрессии и инвазивному росту. Терапия, направленная на молекулярные механизмы ВМ в условиях

гипоксии, может включать использование ингибиторов HIF-1 или молекул, которые блокируют сигнальные пути, связанные с ЕМТ.

ЦИКЛООКСИГЕНАЗА-2 И ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

Циклооксигеназа-2 (COX-2) является важным ферментом, участвующим в производстве простагландина E2. Показано, что она усиливает экспрессию VEGF в опухолях через активацию протеинкиназы C (PKC) в случаях немелкоклеточного рака легкого [105]. W.K.K. Wu и соавт. изучили инвазию, метастазирование и пролиферацию опухолевых клеток, опосредованных связыванием PGE2 с его рецепторами EP1, EP2, EP3, EP4 и запуском через PKC сигнальных путей EGFR и ERK1/2 [106]. Результаты исследования G.D. Basu и соавт. показали, что гиперэкспрессия COX-2 в клетках рака молочной железы значительно увеличивает образование сосудистых структур, в то время как низкий уровень COX-2 не оказывает такого влияния. Эти данные подчеркивают роль COX-2 в ВМ. Кроме того, сигнальный путь COX-2/PGE2/EP3 регулирует экспрессию MMP-2, что также содействует образованию васкулогенных структур [107].

X. Rong и соавт. обнаружили, что как макрофаги M2, так и сигнальный путь PEG2/EP1/PKC участвуют в процессе формирования ВМ, активируя COX-2 [108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижения в изучении молекулярных путей и гистологических подтипов ВМ подчеркивают важность этого феномена в клинической практике. Его роль в диагностике и прогнозировании прогрессии опухолей становится все более значимой. Результаты многочисленных исследований подтверждают, что ВМ очень важна для метастазирования и прогрессирования опухолей. Этот процесс позволяет опухолям обходить ограничения ангиогенеза и создавать собственные васкулярные структуры, что является ключевым механизмом адаптации к гипоксии и обеспечивает доступ к кислороду и питательным веществам.

Изучение ВМ имеет большое значение для разработки новых стратегий лечения онкологических заболеваний. Терапия, направленная на молекулярные механизмы этого процесса, может стать многообещающим подходом для подавления роста опухолей и предотвращения их распространения. Дальнейшие исследования в этой области помогут расширить знания о молекулярных механизмах ВМ и способствовать разработке инновационных терапевтических подходов, нацеленных на блокирование данного процесса. Это позволит улучшить результаты лечения пациентов и повысить показатели выживаемости.

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

- Kuczynski E.A., Vermeulen P.B., Pezzella F. et al. Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16(8):469–93. DOI: 10.1038/s41571-019-0181-9
- Jiang X., Wang J., Deng X. et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2020;39(1):1–19. DOI: 10.1186/s13046-020-01709-5
- Pinto M.P., Sotomayor P., Carrasco-Avino G. et al. Escaping anti-angiogenic therapy: strategies employed by cancer cells. *Int J Mol Sci* 2016;17(9):1–20. DOI: 10.3390/ijms17091489
- Maniotis A.J., Folberg R., Hess A. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155(3):739–52. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Damsky C.H., Fisher S.J. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(5):660–6. DOI: 10.1016/S0955-0674(98)80043-4
- Kučera T., Strilić B., Regener K. et al. Ancestral vascular lumen formation via basal cell surfaces. *PLoS One* 2009;4(1):e4132. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0004132
- Racordon D., Valdivia A., Mingo G. et al. Structural and functional identification of vasculogenic mimicry *in vitro*. *Sci Rep* 2017;7(1):1–12. DOI: 10.1038/s41598-017-07622-w
- Paulis Y.W.J., Soetekouw P.M.M.B., Verheul H.M.W. et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806(1):18–28. DOI: 10.1016/J.BBCAN.2010.01.001
- El Hallani S., Boisselier B., Peglion F. et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 2010;133(Pt 4):973. DOI: 10.1093/BRAIN/AWQ044
- Wang W., Lin P., Han C. et al. Vasculogenic mimicry contributes to lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29(1):60. DOI: 10.1186/1756-9966-29-60/TABLES/4
- Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2006;445(7123):111–5. DOI: 10.1038/nature05384
- Ponti D., Costa A., Zaffaroni N. et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005;65(13):5506–11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
- Liu Z., Li Y., Zhao W. et al. Demonstration of vasculogenic mimicry in astrocytomas and effects of Endostar on U251 cell. *Pathol Res Pract* 2011;207(10):645–51. DOI: 10.1016/J.PRP.2011.07.012
- Gao Y., Zhao X.L., Gu Q. et al. Correlation of vasculogenic mimicry with clinicopathologic features and prognosis of ovarian carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2009;38(9):585–9. (In Chinese). DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2009.09.003
- Lim D., Do Y., Kwon B.S. et al. Angiogenesis and vasculogenic mimicry as therapeutic targets in ovarian cancer. *BMB Rep* 2020;53(6):291. DOI: 10.5483/BMBREP.2020.53.6.060
- Van Der Schaft D.W.J., Hillen F., Pauwels P. et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res* 2005;65(24):11520–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2468
- Cesca K., Oliveira E.M. Confocal laser microscopy for VM analysis with DAPI and phalloidin staining. *Methods Mol Biol* 2022;2514:153–61. DOI: 10.1007/978-1-0716-2403-6_15
- De Andrade Peixoto M., Marques dos Reis E., Marques Porto L. Cancer cell spheroids as a 3D model for exploring the pathobiology of vasculogenic mimicry. *Methods Mol Biol* 2022;2514:45–51. DOI: 10.1007/978-1-0716-2403-6_5
- Kobayashi H., Shirakawa K., Kawamoto S. et al. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled heceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd) 256. *Cancer Res* 2002;62(3):860–6.
- Chen L., Zhang S., Li X. et al. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in intraocular melanoma model. *Oncol Rep* 2009;21(4):989–94. DOI: 10.3892/OR_00000313/HTML
- Zhang S., Zhang D., Wang Y. et al. Morphologic research of microcirculation patterns in human and animal melanoma. *Med Oncol* 2005;23(3):403–9. DOI: 10.1385/MO:23:3:403
- Angara K., Borin T.F., Arbab A.S. Vascular mimicry: a novel neovascularization mechanism driving anti-angiogenic therapy (AAT) resistance in glioblastoma. *Transl Oncol* 2017;10(4):650–60. DOI: 10.1016/j.tranon.2017.04.007
- Delgado-Bellido D., Serrano-Saenz S., Fernández-Cortés M. et al. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol Cancer* 2017;16(1):1–14. DOI: 10.1186/S12943-017-0631-X
- Clemente M., Pérez-Alenza M.D., Illera J.C. et al. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol* 2010;47(2):265–74. DOI: 10.1177/0300985809353167
- Folberg R., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004;112(7–8):508–25. DOI: 10.1111/J.1600-0463.2004.APM11207-0810.X
- Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Hess A.R. et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):411–21. DOI: 10.1038/nrc1092
- Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Kirschmann D.A. et al. Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:151–61. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03218.x
- Kirschmann D.A., Seftor E.A., Hardy K.M. et al. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012;18(10):2726–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3237
- Sun B., Zhang S., Zhao X. et al. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol* 2004;25(6):1609–14. DOI: 10.3892/IJO.25.6.1609/HTML
- McDonald D.M., Munn L., Jain R.K. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol* 2000;156(2):383. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64740-2
- Huijbers E.J.M., Van Beijnum J.R., Thijssen V.L. et al. Role of the tumor stroma in resistance to anti-angiogenic therapy. *Drug Resist Updat* 2016;25:26–37. DOI: 10.1016/J.DRUP.2016.02.002
- Riabov V., Gudima A., Wang N. et al. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol* 2014;5:75. DOI: 10.3389/FPHYS.2014.00075
- Barnett F.H., Rosenfeld M., Wood M. et al. Macrophages form functional vascular mimicry channels *in vivo*. *Sci Rep* 2016;6:36659. DOI: 10.1038/SREP36659
- Hutchenreuther J., Vincent K., Norley C.R. et al. Activation of cancer-associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma. *Matrix Biol* 2018;74:52–61. DOI: 10.1016/J.MATBIO.2018.06.003
- Anderberg C., Pietras K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 2009;8(10):1461–5. DOI: 10.4161/CC.8.10.8557
- Yu Y., Xiao C.H., Tan L.D. et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br J Cancer* 2014;110(3):724–32. DOI: 10.1038/BJC.2013.768
- Heldin C.H., Rubin K., Pietras K. et al. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):806–13. DOI: 10.1038/nrc1456
- Bittner M., Meltzer P., Chen Y. et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406(6795):536–40. DOI: 10.1038/35020115

39. Seftor E.A., Meltzer P.S., Schatteman G.C. et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44(1):17–27. DOI: 10.1016/S1040-8428(01)00199-8
40. Seftor E.A., Meltzer P.S., Kirschmann D.A. et al. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(3):233–46. DOI: 10.1023/A:1015591624171
41. Sun B., Zhang D., Zhao N. et al. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget* 2017;8(18):30502. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.8461
42. Velez D.O., Tsui B., Goshia T. et al. 3D collagen architecture induces a conserved migratory and transcriptional response linked to vasculogenic mimicry. *Nature Commun* 2017;8(1):1–12. DOI: 10.1038/s41467-017-01556-7
43. Li M., Gu Y., Zhang Z. et al. Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 2009;16(2):259–66. DOI: 10.1007/S12253-009-9220-7
44. Lu X.S., Sun W., Ge C.Y. et al. Contribution of the PI3K/MMPs/Ln-5γ2 and EphA2/FAK/Paxillin signaling pathways to tumor growth and vasculogenic mimicry of gallbladder carcinomas. *Int J Oncol* 2013;42(6):2103–115. DOI: 10.3892/IJO.2013.1897/HTML
45. Liu X., He H., Zhang F. et al. m6A methylated EphA2 and VEGFA through IGF2BP2/3 regulation promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer via PI3K/AKT and ERK1/2 signaling. *Cell Death Dis* 2022;13(5):483. DOI: 10.1038/S41419-022-04950-2
46. Schnegg C.I., Yang M.H., Ghosh S.K. et al. Induction of vasculogenic mimicry overrides VEGF-A silencing and enriches stem-like cancer cells in melanoma. *Cancer Res* 2015;75(8):1682–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1855/651621/AM/INDUCTION-OF-VASCULOGENIC-MIMICRY-OVERRIDES-VEGF-A
47. Valdivia A., Mingo G., Aldana V. et al. Fact or fiction, it is time for a verdict on vasculogenic mimicry? *Front Oncol* 2019;9:680. DOI: 10.3389/fonc.2019.00680
48. Williamson S.C., Metcalf R.L., Trapani F. et al. Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer. *Nat Commun* 2016;7(1):1–14. DOI: 10.1038/ncomms13322
49. Liu T.J., Sun B.C., Zhao X.L. et al. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2013;32(5):544–53. DOI: 10.1038/ONC.2012.85
50. Ren K., Yao N., Wang G. et al. Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of human osteosarcoma. *Hum Pathol* 2014;45(10):2120–9. DOI: 10.1016/J.HUMPATH.2014.06.013
51. Tang N.N., Zhu H., Zhang H.J. et al. HIF-1α induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2014;20(47):17894–904. DOI: 10.3748/WJG.V20.I47.17894
52. Xiao T., Zhong W., Zhao J. et al. Polyphyllin I suppresses the formation of vasculogenic mimicry via Twist1/VE-cadherin pathway. *Cell Death Dis* 2018;9(9):906. DOI: 10.1038/S41419-018-0902-5
53. Yeo C., Lee H.J., Lee E.O. Serum promotes vasculogenic mimicry through the EphA2/VE-cadherin/AKT pathway in PC-3 human prostate cancer cells. *Life Sci* 2019;221:267–73. DOI: 10.1016/J.LFS.2019.02.043
54. Zhao N., Sun B.C., Sun T. et al. Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2. *Med Oncol* 2012;29(5):3599–607. DOI: 10.1007/S12032-012-0245-5
55. Chen L.X., He Y.J., Zhao S.Z. et al. Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model. *Cancer Biol Ther* 2011;11(2):229–35. DOI: 10.4161/CBT.11.2.13842
56. Hess A.R., Margaryan N.V., Seftor E.A. et al. Deciphering the signaling events that promote melanoma tumor cell vasculogenic mimicry and their link to embryonic vasculogenesis: role of the Eph receptors. *Dev Dyn* 2007;236(12):3283–96. DOI: 10.1002/DVDY.21190
57. Margaryan N.V., Strizzi L., Abbott D.E. et al. EphA2 as a promoter of melanoma tumorigenicity. *Cancer Biol Ther* 2009;8(3):279. DOI: 10.4161/CBT.8.3.7485
58. Hess A.R., Seftor E.A., Seftor R.E.B. et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003;63(16):4757–62.
59. Li Y., Sun B., Zhao X. et al. MMP-2 and MMP-13 affect vasculogenic mimicry formation in large cell lung cancer. *J Cell Mol Med* 2017;21(12):3741. DOI: 10.1111/JCMM.13283
60. Liu X., Fassett J., Wei Y., Chen Y. Regulation of DDAH1 as a potential therapeutic target for treating cardiovascular diseases. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:619207. DOI: 10.1155/2013/619207
61. Seftor R.E.B., Seftor E.A., Koshikawa N. et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001;61(17):6322–7.
62. Yodkeeree S., Chaiwangyen W., Garbisa S. et al. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J Nutr Biochem* 2009;20(2):87–95. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.12.003
63. Sood A.K., Seftor E.A., Fletcher M.S. et al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001;158(4):1279–88. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64079-5
64. Hess A.R., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 2005;65(21):9851–60. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2172
65. Fu R., Du W., Ding Z. et al. HIF-1α promoted vasculogenic mimicry formation in lung adenocarcinoma through NRP1 upregulation in the hypoxic tumor microenvironment. *Cell Death Disease* 2021;12(4):1–11. DOI: 10.1038/s41419-021-03682-z
66. Li W., Zong S.Q., Shi Q. et al. Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation in human colorectal cancer cells: involvement of HIF-1α, claudin-4, and E-cadherin and vimentin. *Sci Rep* 2016;6:37534. DOI: 10.1038/SREP37534
67. Song Y.Y., Sun L.D., Liu M.L. et al. STAT3, p-STAT3 and HIF-1α are associated with vasculogenic mimicry and impact on survival in gastric adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2014;8(1):431–7. DOI: 10.3892/OL.2014.2059
68. Sun W., Shen Z.Y., Zhang H. et al. Overexpression of HIF-1α in primary gallbladder carcinoma and its relation to vasculogenic mimicry and unfavourable prognosis. *Oncol Rep* 2012;27(6):1990–2002. DOI: 10.3892/OR.2012.1746
69. Wang M., Zhao X., Zhu D. et al. HIF-1α promoted vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma through LOXL2 up-regulation in hypoxic tumor microenvironment. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36(1):60. DOI: 10.1186/S13046-017-0533-1
70. Wu S., Cheng Z., Yu L. et al. [Expression of CD82/KAI1 and HIF-1α in non-small cell lung cancer and their relationship to vasculogenic mimicry]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2011;14(12):918–25. DOI: 10.3779/J.ISSN.1009-3419.2011.12.04
71. Zhang J.G., Zhou H.M., Zhang X. et al. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1α, RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling. *BMC Cancer* 2020;20(1):32. DOI: 10.1186/S12885-019-6501-8
72. Wang Y., Yang R., Wang X. et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, Notch4, DLL4, and KAI1/CD82 in the prediction of metastasis and prognosis in non-small cell lung cancer. *Medicine* 2018;97(52):e13817. DOI: 10.1097/MD.00000000000013817
73. Strizzi L., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert Rev Dermatol* 2009;4(1):67–78. DOI: 10.1586/17469872.4.1.67

74. Strizzi L., Hardy K.M., Seftor E.A. et al. Development and cancer: At the crossroads of Nodal and Notch signaling. *Cancer Res* 2009;69(18):7131. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1199
75. Hardy K.M., Kirschmann D.A., Seftor E.A. et al. Regulation of the embryonic morphogen Nodal by Notch4 facilitates manifestation of the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res* 2010;70(24):10340–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0705
76. Gong W., Sun B., Zhao X. et al. Nodal signaling promotes vasculogenic mimicry formation in breast cancer via the Smad2/3 pathway. *Oncotarget* 2016;7(43):70152. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.12161
77. Zang M., Hu L., Zhang B. et al. Luteolin suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation through inhibiting Notch1-VEGF signaling in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;490(3):913–19. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.140
78. Hsu M.Y., Yang M.H., Schnegg C.I. et al. Notch3 signaling-mediated melanoma-endothelial crosstalk regulates melanoma stem-like cell homeostasis and niche morphogenesis. *Lab Invest* 2017;97(6):725–36. DOI: 10.1038/LABINVEST.2017.1
79. Han C., Sun B., Zhao X. et al. Phosphorylation of STAT3 promotes vasculogenic mimicry by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2017;16(6):1209–19. DOI: 10.1177/1533034617742312
80. Sun T., Zhao N., Zhao X.L. et al. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology* 2010;51(2):545–56. DOI: 10.1002/HEP.23311
81. Hulin J.A., Tommasi S., Elliot D., Mangoni A.A. Small molecule inhibition of DDAH1 significantly attenuates triple negative breast cancer cell vasculogenic mimicry *in vitro*. *Biomed Pharmacother* 2019;111:602–12. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.117
82. Cabral-Pacheco G.A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C. et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci* 2020;21(24):1–53. DOI: 10.3390/IJMS21249739
83. Sharma N., Seftor R.E., Seftor E.A. et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 2002;50(3):189–201. DOI: 10.1002/PROS.10048
84. Noorolai S., Shajari N., Baghban E. et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene* 2019;698:120–8. DOI: 10.1016/J.GENE.2019.02.076
85. Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Meltzer P.S. et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(14):8018–23. DOI: 10.1073/PNAS.131209798
86. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(6):49–6. DOI: 10.1152/AJPCELL.2001.280.6.C1358
87. Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353–64. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7
88. Wang J.Y., Sun T., Zhao X.L. et al. Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma: role in vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2008;7(5):758–66. DOI: 10.4161/CBT.7.5.5765
89. Cheng N., Brantley D., Fang W.B. et al. Inhibition of VEGF-dependent multistage carcinogenesis by soluble EphA receptors. *Neoplasia* 2003;5(5):445–56. DOI: 10.1016/S1476-5586(03)80047-7
90. Frank N.Y., Schatton T., Kim S. et al. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer Res* 2011;71(4):1474–85. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1660
91. Serova M., Tijeras-Raballand A., Dos Santos C. et al. Everolimus affects vasculogenic mimicry in renal carcinoma resistant to sunitinib. *Oncotarget* 2016;7(25):38467–86. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.9542
92. Sun H., Zhang D., Yao Z. et al. Anti-angiogenic treatment promotes triple-negative breast cancer invasion via vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2017;18(4):205–13. DOI: 10.1080/15384047.2017.1294288
93. Brown S., Teo A., Pauklin S. et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells* 2011;20(8):1176–85. DOI: 10.1002/STEM.666
94. Topczewska J.M., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 2006;12(8):925–32. DOI: 10.1038/NM1448
95. Jue C., Lin C., Zhisheng Z. et al. Notch1 promotes vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma by inducing EMT signaling. *Oncotarget* 2017;8(2):2501. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.12388
96. Lee S.L.C., Rouhi P., Dahl Jensen L. et al. Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(46):19485–90. DOI: 10.1073/PNAS.0909228106
97. Wei X., Chen Y., Jiang X. et al. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Mol Cancer* 2021;20(1):1–18. DOI: 10.1186/s12943-020-01288-1
98. De Bock K., Mazzone M., Carmeliet P. Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(7):393–404. DOI: 10.1038/NRCLINONC.2011.83
99. Compennolle V., Brusselmans K., Acker T. et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 2002;8(7):702–10. DOI: 10.1038/NM721
100. Postovit L.M., Abbott D.E., Payne S.L. et al. Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated breast cancer migration. *J Cell Biochem* 2008;103(5):1369–78. DOI: 10.1002/jcb.21517
101. Jin-lu M., Han S.X., Zhu Q. et al. Role of Twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408(4):686–91. DOI: 10.1016/J.BBRC.2011.04.089
102. Zhang S., Li M., Zhang D. et al. Hypoxia influences linearly patterned programmed cell necrosis and tumor blood supply patterns formation in melanoma. *Lab Invest* 2009;89(5):575–86. DOI: 10.1038/LABINVEST.2009.20
103. Sun B., Zhang D., Zhang S. et al. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett* 2007;249(2):188–97. DOI: 10.1016/J.CANLET.2006.08.016
104. Quail D.F., Taylor M.J., Walsh L.A. et al. Low oxygen levels induce the expression of the embryonic morphogen Nodal. *Mol Biol Cell* 2011;22(24):4809–21. DOI: 10.1091/MBE.11-03-0263
105. Luo H., Chen Z., Jin H. et al. Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C pathway in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30(1):6. DOI: 10.1186/1756-9966-30-6
106. Wu W.K.K., Yiu Sung J.J., Lee C.W. et al. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Lett* 2010;295(1):7–16. DOI: 10.1016/J.CANLET.2010.03.015
107. Basu G.D., Liang W.S., Stephan D.A. et al. A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006;8(6):1–11. DOI: 10.1186/BCR1626/FIGURES/6
108. Rong X., Huang B., Qiu S. et al. Tumor-associated macrophages induce vasculogenic mimicry of glioblastoma multiforme through cyclooxygenase-2 activation. *Oncotarget* 2016;7(51):83976–86. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.6930

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

Е.А. Просекина: анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала, координация работы коллектива авторов;

В.А. Шапкина: поиск и подбор источников, написание разделов, посвященных гистологической и молекулярной идентификации васкулогенной мимикрии, редактирование;

А.Е. Карпов: работа с базами данных, обзор публикаций по теме статьи, подготовка иллюстративного материала, редактирование;

Е.Ю. Федорутцева: работа с базами данных, сбор и систематизация данных по эволюционным аспектам васкулогенной мимикрии, выбор наиболее значимых публикаций, редактирование;

А.С. Артемьева: интерпретация данных, научное руководство проектом, редактирование.

Authors' contributions

E.A. Prosekina: data analysis and interpretation, article writing, preparing illustrative material, coordinating the work of the team of authors;

V.A. Shapkina: search and selection of sources, writing sections on histological and molecular identification of vasculogenic mimicry, editing;

A.E. Karpov: working with databases, reviewing publications on the topic of the article, preparing illustrative material, editing;

E.Yu. Fedorutseva: working with databases, collecting and systematizing data on the evolutionary aspects of vasculogenic mimicry, selecting the most significant publications, editing;

A.S. Artemyeva: data interpretation, scientific project management, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Просекина / E.A. Prosekina: <https://orcid.org/0000-0002-1235-3829>

В.А. Шапкина / V.A. Shapkina: <https://orcid.org/0000-0003-1843-2808>

А.Е. Карпов / A.E. Karpov: <https://orcid.org/0000-0003-3913-9619>

Е.Ю. Федорутцева / E.Yu. Fedorutseva: <https://orcid.org/0009-0001-3577-8379>

А.С. Артемьева / A.S. Artemyeva: <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Статья подготовлена без спонсорской поддержки.

Funding. The article was prepared without external funding.

Статья поступила: 07.10.2024. **Принята к публикации:** 26.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 07.10.2024. **Accepted for publication:** 26.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-31-40>

Les Liaisons dangereuses: парадоксальные результаты цитотоксической активности опухолевых макрофагов*

О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, В.В. Синев, О.С. Малашенко, А.Н. Грачев

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

Контакты: Ольга Владимировна Ковалева ovkovaleva@gmail.com

Роль иммунной системы в прогрессии опухолей изучается уже больше века, начиная с гипотезы Пауля Эрлиха о ее значении в сдерживании формирования онкологических заболеваний. Развитие онкоиммунологии позволило подтвердить эту гипотезу и выявить механизмы сложных взаимодействий клеток иммунной системы как с чужеродными агентами, так и с трансформированными клетками организма. Ключевую роль в уничтожении опухолевых клеток играют макрофаги, естественные киллеры и Т-лимфоциты. Среди них особое внимание уделяется макрофагам, ассоциированным с опухолью. Опухолевые клетки способны модулировать активность макрофагов, трансформируя их в клетки с иммуносупрессорными свойствами, способствующими ангиогенезу и ремоделированию внеклеточного матрикса. Таким образом, наибольшую популяцию макрофагов, ассоциированных с опухолью, составляют клетки, обладающие противовоспалительным/проопухолевым фенотипом (M2).

Макрофаги провоспалительного фенотипа (M1) характеризуются продукцией провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и выраженной цитотоксической активностью. Они способны уничтожать опухолевые клетки как напрямую, так и опосредованно, вовлекая другие иммунные клетки. Традиционно цитотоксическая активность макрофагов считается важным механизмом ограничения роста опухолей, однако в ряде случаев ее недостаточно для эффективного контроля над опухолевым процессом. На сегодняшний день есть данные о том, что клетки опухоли способны вырабатывать механизмы защиты от макрофагальной цитотоксичности и приобретать способность ее преодолевать. Более того, опухолевые клетки, появляющиеся в результате взаимодействия с цитотоксическими макрофагами, обладают и другими свойствами, обеспечивающими их ростовые преимущества.

Данный обзор посвящен описанию новой проопухолевой функции макрофагов M1, традиционно считающихся противоопухолевыми.

Ключевые слова: макрофаг, опухоль, цитотоксичность, иммунитет

Для цитирования: Ковалева О.В., Рашидова М.А., Синев В.В. и др. Les Liaisons dangereuses: парадоксальные результаты цитотоксической активности опухолевых макрофагов. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):31–40. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-31-40>

Les Liaisons dangereuses: the paradoxical outcomes of the cytotoxic activity of tumor macrophages*

O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, V.V. Sinyov, O.S. Malashenko, A.N. Gratchev

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

Contacts: Olga Vladimirovna Kovaleva ovkovaleva@gmail.com

*В статье обобщены результаты, полученные в ходе выполнения работы по направлению исследований, появившемуся в результате обсуждения вопроса, заданного М.И. Давыдовым на ученом совете 26 сентября 2016 г.

*This article summarizes the results obtained from our work in the research direction that emerged as a result of a question raised by M.I. Davydov at the joint academic council in September 26, 2016.

The study of the role of the immune system in tumor progression has been ongoing for over a century, starting with Paul Ehrlich's hypothesis on its role in limiting the development of oncological diseases. The development of cancer immunology has confirmed this concept and identified mechanisms of complex interactions between immune system cells and both foreign agents and transformed cells within the organism. Macrophages, natural killers, and T-lymphocytes play key roles in destroying tumor cells. Among them, special attention is given to tumor-associated macrophages. Tumor cells can modulate macrophage activity, transforming them into cells with immunosuppressive properties that promote angiogenesis and extracellular matrix remodeling. As a result, the largest population of tumor-associated macrophages consists of cells with an anti-inflammatory/pro-tumor phenotype (M2).

Macrophages with an anti-inflammatory phenotype (M1) are characterized by the production of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and strong cytotoxic activity. They can directly or indirectly destroy tumor cells by involving other immune cells. Traditionally, the cytotoxic activity of macrophages is considered an important mechanism in limiting tumor growth, but in some cases, it is insufficient for effective tumor control. Recent data suggest that tumor cells can develop defense mechanisms against macrophage cytotoxicity and acquire the ability to overcome it. Moreover, tumor cells resulting from interaction with cytotoxic macrophages possess other properties that provide growth advantages.

This review is dedicated to describing a new pro-tumor function of M1 macrophages, traditionally considered anti-tumor.

Keywords: macrophage, tumor, cytotoxicity, immunity

For citation: Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Sinyov V.V. et al. Les Liaisons dangereuses: the paradoxical outcomes of the cytotoxic activity of tumor macrophages. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):31–40. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-31-40>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время иммунотерапия считается одним из наиболее перспективных подходов к лечению злокачественных новообразований. Современные достижения в этой области демонстрируют обнадеживающие результаты, включая повышение показателей общей выживаемости пациентов и увеличение частоты объективных ответов при различных типах опухолей [1]. Однако одним из ключевых ограничений данного метода является избирательная эффективность и развитие резистентности, что обусловлено как селекцией опухолевых клеток, способных противостоять цитотоксическому воздействию врожденного иммунитета, так и снижением активности иммунных эффекторов [2]. Глубокое понимание механизмов адаптации опухоли к иммунному давлению является необходимым условием для создания более эффективных стратегий противоопухолевого лечения.

Одним из немаловажных предиктивных факторов положительного ответа на иммунотерапию является состав микроокружения опухоли [3]. Оно представляет собой гетерогенную и динамичную систему, включающую стромальные компоненты, внеклеточный матрикс, сосудистую сеть, иммунные клетки и широкий спектр сигнальных молекул. Опухолевое микроокружение играет ключевую роль в регуляции роста, инвазии опухоли и метастазировании, создавая благоприятные условия для опухолевых клеток и способствуя их уходу из-под иммунологического надзора [4].

Среди клеток врожденного иммунитета, которые входят в состав опухолевого микроокружения, макрофаги являются доминирующей популяцией [5]. Одной из ключевых особенностей макрофагов служит их пластичность, т. е. способность изменять свой фенотип

и спектр функций в ответ на изменение состава микроокружения. На этом принципе построены многие терапевтические стратегии, направленные на перепрограммирование макрофагов в противоопухолевый фенотип [6]. Однако следует отметить, что на данный момент ни одна из названных стратегий не внедрена в клиническую практику, поскольку данные методы не дают хороших результатов или имеют крайне низкую эффективность. Возможно, цитотоксические макрофаги в опухоли — это не так хорошо, как считалось ранее?

Цель обзора — систематизация данных о проопухолевой функции противоопухолевых макрофагов.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МАКРОФАГОВ

Макрофаги обладают высокой пластичностью и способны выполнять как противоопухолевые, так и проопухолевые функции. В ответ на действие цитокинов микроокружения опухоли они могут поляризоваться в классически активированные макрофаги (M1), обладающие цитотоксическими и провоспалительными свойствами, или в альтернативно активированные макрофаги (M2), характеризующиеся иммуномодулирующим, ангиогенным и тканереформирующим потенциалами [7, 8].

Макрофаги M1 индуцируются провоспалительным цитокином интерфероном γ (IFN γ) или активируются при взаимодействии с компонентами бактерий, такими как компонент бактериальной стенки липополисахарид (LPS). Они характеризуются выраженной продукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкинов (IL) IL-1 β , -6, -12, -23, фактора некроза опухоли (TNF)), активным синтезом монооксида азота (NO) и реактивных форм кислорода (ROS), что

способствует уничтожению патогенов и злокачественных клеток. Макрофаги M1 также экспрессируют большое количество молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II) и молекул коstimуляции (CD80, CD86), что усиливает их антигенпрезентирующую функцию и позволяет стимулировать адаптивный иммунитет [9, 10].

Макрофаги M2 формируются под воздействием IL-4 и IL-13, что приводит к экспрессии альтернативных маркеров, таких как CD206 (маннозный рецептор), CD163, FcγRI, -II, -III, CCL18 и др. [11]. Они продуцируют противовоспалительные цитокины (IL-10, IL-1RA, трансформирующий фактор роста β (TGF-β)), способствуют ангиогенезу за счет продукции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и ремоделированию тканей, производя компоненты внеклеточного матрикса и ферменты для его перестройки (фибронектин, фактор XIIIa, матриксная металлопротеиназа (MMP) 12) [12, 13]. В литературе M2-макрофаги иногда подразделяются на несколько подтипов: M2a — индуцируются IL-4/IL-13, участвуют в заживлении ран и антипаразитарном иммунитете; M2b — продуцируют IL-10, но сохраняют некоторую воспалительную активность; M2c — активируются под действием IL-10 и TGF-β, обладают выраженной иммунорегуляторной функцией; M2d — участвуют в ангиогенезе и опухолевой прогрессии, ассоциированы с секрецией VEGF [14, 15].

Согласно результатам недавних исследований, несмотря на то, что бинарное деление на макрофаги M1 и M2 является в какой-то степени упрощенной концепцией, оно остается наиболее широко используемым и удобным инструментом для описания их функциональной поляризации. Альтернативные классификации, предлагающие выделение более детализированных подтипов, представляют собой частные случаи и фактически указывают на то, что каждый стимулирующий фактор, способный воздействовать на макрофаги, приводит к появлению у них уникальных особенностей. Также с учетом взаимодействия индивидуальных стимулов, вероятно, количество подтипов макрофагов может достигать нескольких сотен. Основная проблема сложных классификаций макрофагов заключается в их высокой вариабельности в зависимости от экспериментальных условий, типа ткани, источника и методики анализа. Кроме того, опухолевое микроокружение формирует смешанные популяции макрофагов с динамически изменяющимся фенотипом, что делает жесткую категоризацию затруднительной. В клинической и экспериментальной практике продолжает использоваться M1/M2-модель, поскольку она позволяет эффективно описывать ключевые различия про- и противоопухолевых функций макрофагов, а также разрабатывать терапевтические стратегии, направленные на их репрограммирование.

МАКРОФАГИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОПУХОЛЬЮ

Проопухолевые функции макрофагов, ассоциированных с опухолью

Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), в большинстве случаев демонстрируют M2-подобный фенотип, способствуя опухолевой прогрессии путем подавления адаптивного иммунного ответа, стимуляции ангиогенеза и ремоделирования внеклеточного матрикса [16]. Можно выделить несколько основных механизмов проопухолевой функции макрофагов, в числе которых:

- секреция факторов роста — продукция эпидермального фактора роста (EGF), VEGF и некоторых других цитокинов стимулирует пролиферацию и ангиогенез; продукция фактора, стимулирующего колонии макрофагов (CSF-1), поддерживает выживание и активность макрофагов в опухоли [17, 18];
- подавление противоопухолевого иммунитета — секреция иммуносупрессивных молекул (TGF-β, IL-10, аргиназы) снижает активность цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных NK-клеток (NK — естественные киллеры), экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1) на поверхности макрофагов подавляет Т-клеточный ответ [19, 20];
- ангиогенез и ремоделирование тканей — секреция VEGF и матриксных металлопротеиназ (MMP) способствует формированию сосудистой сети опухоли, разрушение внеклеточного матрикса облегчает инвазию опухолевых клеток и метастазирование [21, 22];
- поддержка стволовых свойств опухолевых клеток — MAO взаимодействуют с опухолевыми стволовыми клетками, поддерживая их выживание, и способствует резистентности к терапии [23];
- способствование метастазированию — миграция макрофагов создает условия для формирования преметастатических ниш в отдаленных органах, подготавливая условия для закрепления опухолевых клеток, например, посредством сигнального пути GM-CSF-STAT5-AHR-PD-L1 [24, 25].

Более того, известно, что повышенная инфильтрация MAO в строме опухоли является маркером неблагоприятного прогноза при большинстве солидных опухолей [26]. Результаты исследования В. Yi и соавт. показали, что маркеры MAO и их пространственная локализация могут иметь различное прогностическое значение в случае рака легкого [27]. Понимание механизмов инфильтрации опухоли MAO способствует улучшению исходов лечения пациентов с данной патологией. Также оценена прогностическая значимость маркеров MAO, таких как CD68 и CD163, при плоскоклеточной карциноме головы и шеи. Результаты этих

исследований свидетельствуют о том, что МАО могут служить прогностическими факторами при данном заболевании [28]. В ходе метаанализа, посвященного роли МАО при раке предстательной железы, установлено, что высокая плотность этих клеток коррелирует с более низкими показателями выживаемости, большей градацией опухоли по шкале Глисона, а также наличием как регионарных, так и отдаленных метастазов. При этом наблюдалось увеличение количества МАО по мере прогрессирования заболевания [29].

Результаты исследований показали, что высокая плотность МАО является неблагоприятным прогностическим фактором при раке молочной железы. Кроме того, выявлена связь между повышенным содержанием МАО и более агрессивным фенотипом опухолевых клеток [30]. Данные метаанализа, посвященного оценке прогностической значимости МАО при раке яичников, продемонстрировали, что повышенное содержание М2 связано с худшим прогнозом и более поздними стадиями заболевания [31]. Также установлено, что большое количество М2-макрофагов в строме опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и при меланоме [32]. Эти макрофаги способствуют подавлению иммунного ответа и активному формированию новых сосудов, а также пролиферации и распространению опухолевых клеток из первичного очага. Кроме того, независимо от фенотипа, высокая концентрация макрофагов в опухолевой строме рака мочевого пузыря коррелирует с неблагоприятным прогнозом и выраженными негативными клинико-морфологическими характеристиками заболевания [33, 34]. В случае глиобластомы показано, что высокая плотность МАО в опухоли связана с худшим прогнозом. Эти макрофаги способствуют росту опухоли, ангиогенезу и подавлению иммунного ответа, создавая благоприятные условия для прогрессии опухолей данной локализации [35]. Неблагоприятная прогностическая роль МАО продемонстрирована также для почечно-клеточного рака [36, 37] и злокачественных опухолей, происходящих из оболочек периферических нервов [38].

Противоопухолевые функции макрофагов, ассоциированных с опухолью

В определенных условиях проопухолевые макрофаги могут выполнять противоопухолевые функции посредством следующих механизмов:

- реполяризации в М1-фенотип — под воздействием цитокинов (IFN γ , TNF) или терапевтических агентов (например, блокаторов иммунных чекпойнтов) макрофаги могут сменить фенотип с проопухолевого М2 на противоопухолевый М1 и, продуцируя ROS, начать уничтожать опухолевые клетки [39]. Однако этот механизм на сегодняшний день остается предметом дискуссий;
- фагоцитоза и презентации антигенов — даже макрофаги провоспалительного фенотипа могут осуществлять захват частей опухолевых клеток

и презентировать опухолевые антигены, что способствует активации Т-клеточного ответа; улучшение антигенпрезентирующей функции макрофагов (например, за счет стимуляции Толл-подобных рецепторов (TLR) или модуляции экспрессии МНС-II) может усилить их противоопухолевую активность [12];

- регуляции иммунного ответа через взаимодействие с другими клетками — взаимодействие макрофагов с NK-клетками и CD8⁺-Т-лимфоцитами может способствовать усилению противоопухолевого иммунитета [40]; определенные подтипы М2-макрофагов могут продуцировать IL-12, обеспечивая активацию цитотоксических Т-клеток [41];
- участия в ремоделировании опухолевого микроокружения — в определенных условиях макрофаги могут снижать гипоксию в опухолевой ткани, что делает ее более уязвимой к терапии; некоторые макрофаги способны подавлять ангиогенез (например, через продукцию ангиостатических факторов, таких как тромбоспондин-1) [42].

В литературе описан ряд опухолей (в основном желудочно-кишечного тракта), для которых высокая инфильтрация макрофагами ассоциирована с благоприятным прогнозом [43]. Результаты исследований колоректального рака и рака пищевода показали, что большая плотность МАО, особенно М2-фенотипа, может коррелировать с более высокими показателями выживаемости пациентов [44, 45]. Предполагается, что в этом контексте МАО способствуют противоопухолевому иммунному ответу и ограничению прогрессии опухоли [45]. В случае опухолей желудочно-кишечного тракта влияние М2-макрофагов на прогноз заболевания может быть обусловлено взаимодействием с резидентным микробиомом. Каким образом он способен влиять на функции макрофагов? Одним из возможных путей этого является активация врожденного иммунитета через TLR-рецепторы. Компоненты микробиоты, такие как LPS, пептидогликаны и экзополисахариды, могут активировать TLR макрофагов [46]. Например, активация TLR4 приводит к активации макрофагов и реполяризации из проопухолевого М2-фенотипа в противоопухолевый М1-фенотип и продукции провоспалительных цитокинов (IL-12, TNF) [47]. Такой механизм задействован при использовании противоопухолевой вакцины, разработанной в конце XIX в. американским хирургом-онкологом Уильямом Коли. Еще одним механизмом является воздействие метаболитов микробиоты: короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs), такие как бутират, ацетат и пропионат, регулируют воспаление и могут усиливать противоопухолевую активность макрофагов, а метаболиты *Faecalibacterium prausnitzii* и *Akkermansia muciniphila* способны снижать иммуносупрессию опухолевого микроокружения [48, 49]. Также некоторые роды бактерий в целом, например *Clostridium* и *Bacteroides*, изменяют продукцию цитокинов IL-10 и TGF- β

макрофагами, что ведет к снижению иммуносупрессии в микроокружении опухоли [50]. В целом определенные микробные сообщества могут способствовать изменению функциональной активности М2-макрофагов, которые, в свою очередь, участвуют в подавлении хронического воспаления и поддержании тканевого гомеостаза, что в ряде случаев ограничивает прогрессию опухоли. Таким образом, взаимодействие резидентного микробиома и МАО способно положительно влиять на течение заболевания.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ МАКРОФАГИ

Противоопухолевая функция макрофагов

Цитотоксическая активность макрофагов позволяет им уничтожать опухолевые клетки как напрямую, так и опосредованно. Прямые механизмы цитотоксичности включают фагоцитоз, выработку провоспалительных цитокинов и медиаторов воспаления, таких как NO и активные формы кислорода, которые запускают процессы программируемой клеточной гибели в клетке-мишени. Кроме того, макрофаги привлекают в зону воспаления клетки адаптивного иммунитета, включая Т-лимфоциты [47].

Механизмы цитотоксической активности макрофагов могут быть разделены на контактзависимые и независимые от прямого контакта с клеткой-мишенью. Контактнезависимый механизм цитотоксической активности макрофагов осуществляется без прямого физического контакта макрофагов с клетками-мишенями [6]. Вместо этого макрофаги используют растворимые молекулы (цитокины, хемокины, активные формы кислорода), которые они секретируют. Макрофаги способны продуцировать широкий спектр растворимых молекул, включая провоспалительные цитокины (TNF, IL-1 β , IL-6), хемокины и активные формы кислорода (например, супероксидный радикал, NO). Эти биологически активные вещества играют ключевую роль в регуляции деятельности клеток-мишеней. Они способны изменять их функциональное состояние, способствуя активации различных сигнальных путей, которые могут либо поддерживать клеточную активность, либо запускать механизмы гибели клеток. Одним из таких механизмов является индуцированный оксидативный стресс. Активные формы кислорода и азота могут накапливаться в клетках-мишенях, приводя к повреждению их мембран, ДНК и других критически важных внутриклеточных компонентов. В конечном счете эти повреждения приводят к программируемой клеточной гибели (апоптозу). Кроме того, при взаимодействии с различными клетками иммунной системы, включая Т-лимфоциты и антигенпрезентирующие клетки, макрофаги способны продуцировать специфические лимфокины. Среди них выделяют фактор активации макрофагов (MAF) и фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), которые не только усиливают функциональную активность самих макрофагов, но и повышают их цито-

токсические свойства, что позволяет им более эффективно уничтожать патогены и атипичные клетки, а также координировать иммунный ответ в целом [51, 52].

Лимфокины могут активировать макрофаги через их рецепторы, что приводит к усилению продукции цитокинов и других медиаторов воспаления, усиливая тем самым процесс клеточной гибели клеток-мишеней. В некоторых случаях контактнезависимая цитотоксичность может быть опосредована активацией комплемента. В этом случае компоненты комплемента, такие как C3, могут связываться с поверхностью опухолевых клеток, что способствует их опсонизации. Она, в свою очередь, активирует макрофаги через рецепторы комплемента (CR3 и CR4), что усиливает их фагоцитарную активность и приводит к уничтожению клеток-мишеней [53].

Макрофаги способны взаимодействовать с различными клетками иммунной системы, включая Т-лимфоциты, посредством обмена сигнальными молекулами — цитокинами. Такое взаимодействие играет большую роль в модуляции их функциональной активности, усиливая цитотоксический потенциал макрофагов без необходимости непосредственного контакта с клетками-мишенями. Одним из примеров данной регуляции является секреция Т-лимфоцитами цитокинов, таких как IL-15. Этот фактор активирует макрофаги, усиливая их способность к уничтожению опухолевых клеток, что способствует более эффективному противоопухолевому иммунному ответу [54].

Контактзависимый механизм цитотоксической активности макрофагов включает их взаимодействие с клетками-мишенями через прямой физический контакт. В этом процессе макрофаги используют свои рецепторы для распознавания и уничтожения опухолевых или инфицированных клеток. Ключевые аспекты контактзависимой цитотоксической активности макрофагов включают антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и фагоцитоз [55]. ADCC — это механизм, при котором макрофаги уничтожают клетки-мишени с помощью антител, связанных с их поверхностью. В этом процессе большую роль играют Fc-рецепторы на поверхности макрофагов. Когда антитела связываются с антигенами на опухолевых клетках, их Fc-фрагмент становится доступным для Fc-рецепторов макрофагов. Это взаимодействие активирует макрофаги и запускает механизм фагоцитоза [56]. Связь антител с клетками-мишенями не только облегчает их поглощение макрофагами, но и активирует другие механизмы цитотоксичности, включая высвобождение различных медиаторов, таких как активные формы кислорода и азота, которые могут повреждать клетки-мишени [56]. Также в этот процесс вовлекаются различные цитокины, например IL-15, -18, -2, которые могут усилить активность макрофагов и повысить эффективность уничтожения опухолевых клеток. ADCC играет большую роль и в механизмах действия ряда иммунотерапевтических препаратов, основанных

на моноклональных антителах. Эти препараты, связываясь с опухолевыми клетками, могут усиливать процесс ADCC, направляя иммунный ответ против злокачественных клеток [57, 58].

Иногда контактзависимая цитотоксичность может осуществляться без участия антител. В таких случаях макрофаги используют другие рецепторы для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. Например, макрофаги могут взаимодействовать с опухолевыми клетками через определенные молекулы на их поверхности (например, рецепторы распознавания паттернов (PRRs)), что инициирует процесс фагоцитоза или клеточной гибели [59]. Данные о механизме антителонезависимой цитотоксической активности макрофагов пока ограничены.

Таким образом, основная роль макрофагов в опухолевом микроокружении заключается в обеспечении противоопухолевого иммунного ответа. Рекрутированные моноциты сначала дифференцируются в M1-макрофаги, которые выделяют различные воспалительные медиаторы, способствующие активации иммунной системы. Некоторые из этих молекул могут инициировать положительные обратные связи. Например, IL-12, продуцируемый M1-макрофагами, активирует NK- и дендритные клетки, что, в свою очередь, стимулирует продукцию IFN γ , усиливая цитотоксический эффект макрофагов. Это выражается в увеличении синтеза активных форм кислорода и NO, что способствует активации апоптоза в клетке-мишени.

Проопухолевая функция макрофагов

Несмотря на то что M1-макрофаги традиционно ассоциируются с противоопухолевой активностью благодаря их способности секретировать провоспалительные цитокины, их цитотоксическая активность может оказывать и проопухолевый эффект. Например, они способны активировать регуляторные Т-клетки (Treg) и миелоидные супрессорные клетки (MDSC), что может привести к подавлению противоопухолевого иммунного ответа и опухолевой прогрессии. Кроме того, под воздействием IFN γ макрофаги начинают экспрессировать IDO1, что может содействовать подавлению активности Т-лимфоцитов [60, 61]. Кроме того, TNF активирует ангиогенез, пролиферацию, инвазию и метастазирование определенных типов опухолевых клеток, что связано с активацией сигнального пути транскрипционного ядерного фактора κ B (NF- κ B). Например, TNF вызывает потерю экспрессии белка gp100 в клетках меланомы, в то время как уровень рецептора фактора нейтрофилов (NGFR) повышается. Это влияет на опухолевые клетки, поскольку NGFR может инактивировать опухолевый супрессор p53, и его повышенная экспрессия коррелирует с агрессивным поведением опухоли [62]. TNF также способствует формированию микроокружения, которое благоприятствует опухолевому росту, привлекая эндотелиальные клетки, фибробласты и перитциты. MMR,

секретируемые цитотоксическими макрофагами, способствуют инвазии и метастазированию опухоли [63]. Активные формы кислорода, NO и различные провоспалительные цитокины, такие как IL-6, TNF и IFN γ , могут вызывать мутации в опухолевых клетках и их микроокружении [64].

На сегодняшний день сохраняется исторически сложившаяся парадигма поляризации макрофагов на фенотипы M1 и M2, согласно которой макрофаги M1 обладают выраженной цитотоксической активностью и участвуют в противоопухолевом иммунном ответе, тогда как M2-макрофаги, напротив, способствуют росту и прогрессированию опухоли [65]. Кроме того, активно исследуются ассоциированные с макрофагами подходы к противоопухолевой терапии, направленные на перепрограммирование M2-макрофагов в фенотип M1, что рассматривается как перспективная стратегия для подавления роста злокачественных новообразований [16]. Однако все больше научных данных свидетельствует о том, что M1-макрофаги не всегда оказывают противоопухолевое действие. В ряде случаев они могут способствовать прогрессии опухоли, создавая условия, благоприятствующие ее росту и распространению.

Результаты наших исследований, посвященных изучению фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы, а также резидентного микробиома опухолей, позволили выдвинуть гипотезу о проопухолевой функции макрофагов M1. Мы предположили, что они могут способствовать прогрессии опухоли за счет селекции клеток с повышенной злокачественностью, обладающих устойчивостью к их цитотоксическому воздействию. Нами разработана и создана уникальная клеточная модель, позволяющая получать опухолевые клетки различных гистологических типов, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, активируемой различными лигандами Толл-подобных и NOD-рецепторов [66]. Полученные в результате отбора устойчивые сублинии опухолевых клеток продемонстрировали усиление злокачественного фенотипа как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, данные клетки характеризовались повышенной скоростью пролиферации *in vitro*.

Результаты экспериментальных исследований на животных моделях показали, что опухолевые клетки, обладающие устойчивостью к цитотоксическому воздействию макрофагов, отличаются более агрессивным поведением. В частности, они продемонстрировали ускоренный рост подкожных ксенографтов по сравнению с клетками исходной линии, что указывает на их повышенный злокачественный потенциал. Опухоли, сформированные резистентными к цитотоксическому действию макрофагов клетками, характеризовались большим размером, более выраженной васкуляризацией и наличием обширных очагов некроза, что свидетельствует об их высокой степени злокачественности. Интересно, что в таких опухолях наблюдалось снижение количества резидентных макрофагов, что может

указывать на изменение состава опухолевого микроокружения в сторону уменьшения содержания клеток врожденного иммунитета. Таким образом, анализ клеточных характеристик как *in vitro*, так и *in vivo* показал, что приобретение опухолевыми клетками резистентности к цитотоксическому воздействию макрофагов оказывает схожее опухоль-промотирующее действие на различные клеточные линии, способствуя формированию более злокачественного фенотипа [67].

Проведенный далее транскриптомный анализ впервые выявил изменения в регуляции ключевых сигнальных путей в клетках рака легкого, устойчивых к цитотоксическому действию макрофагов. Каждый из этих путей может вносить свой вклад в усиление пролиферативных свойств опухолевых клеток, способствуя повышению злокачественного потенциала. На основании полученных данных удалось идентифицировать ряд генов-мишеней, отвечающих за приобретение опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксическому действию макрофагов.

Исследование молекулярных механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов показало, что одним из ключевых факторов, участвующих в этом процессе, является растворимая форма TNF. Именно она в значительной степени определяет цитотоксический потенциал макрофагов и в ряде случаев способствует развитию иммунологической толерантности опухолевых клеток. Полученные результаты позволяют предположить, что таргетное подавление активности TNF может представлять собой перспективный терапевтический подход для преодоления лекарственной устойчивости опухоли в рамках иммунотерапии.

Результаты последних исследований согласуются с полученными нами данными и показывают, что макрофаги M1, традиционно считающиеся противоопухолевыми клетками, могут в некоторых случаях оказывать проопухолевый эффект, усиливая инвазивность и пролиферацию опухолевых клеток через активацию различных сигнальных путей.

Результаты одного исследования, выполненного на модели меланомы, показали, что кондиционированная среда от M1-макрофагов способствует инвазивности опухолевых клеток. Это происходит через активацию сигнального пути TNFR–NF-κB, который является ключевым фактором регуляции клеточной миграции и инвазии. NF-κB участвует в активации ряда генов, которые контролируют экспрессию MMP и других молекул, задействованных в разрушении межклеточного матрикса и миграции клеток. Результат этого взаимодействия – увеличение способности опухолевых клеток проникать в окружающие ткани, что способствует их метастазированию. Таким образом, макрофаги M1 могут участвовать в процессе метастазирования, что является неожиданным для традиционной парадигмы их противоопухолевой активности [68].

Аналогичные данные получены в исследовании гепатоцеллюлярной карциномы. Кондиционированная среда от M1-макрофагов стимулировала пролиферацию опухолевых клеток. В данном случае активация сигнального пути NF-κB обеспечивала повышенные пролиферацию и антиапоптотическую активность опухолевых клеток, что вызывало активацию молекул, которые способствовали продвижению клеток через клеточный цикл, увеличивая число клеток в фазах S и G2/M. Этот процесс содействовал росту опухоли и ее прогрессии, что еще раз

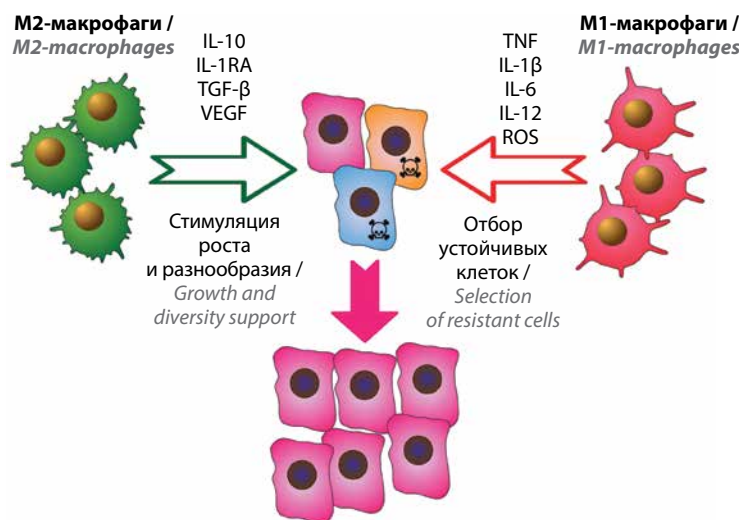


Рис. 1. Комплексное влияние макрофагов на опухолевые клетки. IL – интерлейкин; TGF-β – трансформирующий фактор роста β; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; TNF – фактор некроза опухоли; ROS – реактивные формы кислорода

Fig. 1. The complex impact of macrophages on tumor cells. IL – interleukin; TGF-β – transforming growth factor β; VEGF – vascular endothelial growth factor; TNF – tumor necrosis factor; ROS – reactive oxygen species

подтверждает важность NF-κB в механизмах проопухолевой активности макрофагов M1 [69].

Кроме того, в случае рака желудка установлено, что кондиционированная M1-макрофагами среда также стимулирует пролиферацию опухолевых клеток. Это указывает на то, что макрофаги данного фенотипа могут поддерживать рост и развитие опухолей, даже при других типах рака, не только в моделях меланомы и гепатоцеллюлярной карциномы, и что роль активированных макрофагов в микроокружении опухоли более сложна, чем считалось ранее [70].

Наконец, результаты исследования, посвященного плоскоклеточному раку слизистой оболочки рта, продемонстрировали, что макрофаги M1 усиливают выживаемость и инвазивность опухолевых клеток, активируя рецептор ErbB2. Этот рецептор, который является членом семейства рецепторных тирозинкиназ, играет ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации, выживаемости и инвазии. Под воздействием активации ErbB2 макрофаги усиливают прогрессию опухоли, что подтверждает их способность не только стимулировать метастазирование, но и поддерживать выживаемость опухолевых клеток [71].

Комплексное влияние макрофагов на опухолевые клетки представлено на рис. 1.

Результаты исследований последних лет показывают, что M1-макрофаги могут играть более сложную и противоречивую роль в опухолевом процессе. В то время как они традиционно считаются клетками, способными подавлять рост опухоли, в некоторых случаях их активированные формы способствуют инвазивности, пролиферации и выживаемости опухолевых клеток посредством различных механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия роль иммунной системы в опухолевом процессе привлекает все большее внимание исследователей, что связано с достижениями в областях онкоиммунологии и иммунотерапии. Макрофаги, наряду с другими клетками иммунной системы, имеют большое значение во взаимодействии с опухолевыми клетками, что способствует как их уничтожению, так и опухолевой прогрессии. Однако природные механизмы этого взаимодействия гораздо более сложны и многогранны, чем считалось ранее. Опухолевые клетки могут перепрограммировать иммунные клетки и подавлять их противоопухолевую активность, а также развивать устойчивость к цитотоксическому воздействию макрофагов.

Результаты последних исследований свидетельствуют о важности пересмотра традиционного понимания роли макрофагов в прогрессии опухоли. Они не только содействуют уничтожению опухолевых клеток, но и участвуют в отборе более злокачественных клеток, усиливая их инвазивность и способность к метастазированию. Эти данные объясняют неэффективность в ряде случаев подходов, нацеленных на репрограммирование макрофагов в цитотоксические клетки. В связи с этим необходимость пересмотра и адаптации стратегии опосредованной макрофагами терапии становится особенно актуальной. Важно сосредоточиться на комплексных подходах, которые могут включать не только перепрограммирование макрофагов, но и снижение их количества в опухолевом микроокружении в целом, что может улучшить результаты противоопухолевого лечения и значительно повысить эффективность иммунотерапевтических методов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Liu C., Yang M., Zhang D. et al. Clinical cancer immunotherapy: current progress and prospects. *Front Immunol* 2022;13:961805. DOI: 10.3389/fimmu.2022.961805
2. Wang S., Xie K., Liu T. Cancer immunotherapies: from efficacy to resistance mechanisms – not only checkpoint matters. *Front Immunol* 2021;12:690112. DOI: 10.3389/fimmu.2021.690112
3. Murciano-Goroff Y.R., Warner A.B., Wolchok J.D. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res* 2020;30(6):507–19. DOI: 10.1038/s41422-020-0337-2
4. Wang Q., Shao X., Zhang Y. et al. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Med* 2023;12(10):11149–65. DOI: 10.1002/cam4.5698
5. Franklin R.A., Li M.O. Ontogeny of tumor-associated macrophages and its implication in cancer regulation. *Trends Cancer* 2016;2(1):20–34. DOI: 10.1016/j.trecan.2015.11.004
6. Mantovani A., Allavena P., Marchesi F., Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21(11):799–820. DOI: 10.1038/s41573-022-00520-5
7. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018;233(9):6425–40. DOI: 10.1002/jcp.26429
8. Locati M., Curtale G., Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Ann Rev Pathol* 2020;15:123–47. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
9. Yunna C., Mengru H., Lei W., Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* 2020;877:173090. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173090
10. Chen S., Saeed A., Liu Q. et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):207. DOI: 10.1038/s41392-023-01452-1
11. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Kothe K. et al. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 2006;211(6–8):473–86. DOI: 10.1016/j.imbio.2006.05.017
12. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015;2015:816460. DOI: 10.1155/2015/816460
13. Gratchev A., Kzhyshkowska J., Utikal J., Goerdts S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol* 2005;61(1):10–7. DOI: 10.1111/j.0300-9475.2005.01524.x

14. 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.
15. Strizova Z., Benesova I., Bartolini R. et al. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clin Sci (Lond)* 2023;137(15):1067–93. DOI: 10.1042/CS20220531
16. Boutilier A.J., Elsawa S.F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci* 2021;22(13):6995. DOI: 10.3390/ijms22136995
17. Lai Y.S., Wahyuningtyas R., Aui S.P., Chang K.T. Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. *J Cell Mol Med* 2019;23(2):1257–67. DOI: 10.1111/jcmm.14027
18. Jones C.V., Ricardo S.D. Macrophages and CSF-1: implications for development and beyond. *Organogenesis* 2013;9(4):249–60. DOI: 10.4161/org.25676
19. Kratochvill F., Neale G., Haverkamp J.M. et al. TNF counterbalances the emergence of M2 tumor macrophages. *Cell Rep* 2015;12(11):1902–14. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.033
20. Li W., Wu F., Zhao S. et al. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: a key player in tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022;67:49–57. DOI: 10.1016/j.cytofr.2022.07.004
21. Zajac E., Schweighofer B., Kupriyanova T.A. et al. Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. *Blood* 2013;122(25):4054–67. DOI: 10.1182/blood-2013-05-501494
22. Kerneur C., Cano C.E., Olive D. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer. *Front Immunol* 2022;13:1026954. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1026954
23. Chen W., Chen M., Hong L. et al. M2-like tumor-associated macrophage-secreted CCL2 facilitates gallbladder cancer stemness and metastasis. *Exp Hematol Oncol* 2024;13(1):83. DOI: 10.1186/s40164-024-00550-2
24. Jiang X., Wang J., Lin L. et al. Macrophages promote pre-metastatic niche formation of breast cancer through aryl hydrocarbon receptor activity. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9(1):352. DOI: 10.1038/s41392-024-02042-5
25. Wang Y., Jia J., Wang F. et al. Pre-metastatic niche: formation, characteristics and therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9(1):236. DOI: 10.1038/s41392-024-01937-7
26. Xu Y., Wang X., Liu L. et al. Role of macrophages in tumor progression and therapy (review). *Int J Oncol* 2022;60(5):57. DOI: 10.3892/ijo.2022.5347
27. Yi B., Cheng Y., Chang R. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages polarization markers in lung cancer: a pooled analysis of 5105 patients. *Biosci Rep* 2023;43(2):BSR20221659. DOI: 10.1042/BSR20221659
28. Troiano G., Caponio V.C.A., Adipietro I. et al. Prognostic significance of CD68(+) and CD163(+) tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2019;93:66–75. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.04.019
29. Cortese N., Carriero R., Laghi L. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages: past, present and future. *Seminars Immunol* 2020;48:101408. DOI: 10.1016/j.smim.2020.101408
30. Allison E., Edirimanne S., Matthews J., Fuller S.J. Breast cancer survival outcomes and tumor-associated macrophage markers: a systematic review and meta-analysis. *Oncol Ther* 2023;11(1):27–48. DOI: 10.1007/s40487-022-00214-3
31. Yuan X., Zhang J., Li D. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2017;147(1):181–7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2017.07.007
32. Harjes U. Educating macrophages in melanoma. *Nat Rev Cancer* 2021;21(1):4. DOI: 10.1038/s41568-020-00317-x
33. Qi D., Lu Y., Qu H. et al. Independent prognostic value of CLDN6 in bladder cancer based on M2 macrophages related signature. *iScience* 2024;27(3):109138. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109138
34. Yang G., Zhang L., Liu M. et al. CD163+ macrophages predict a poor prognosis in patients with primary T1 high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol* 2019;37(12):2721–6. DOI: 10.1007/s00345-018-02618-1
35. Montemurro N., Pahwa B., Tayal A. et al. Macrophages in recurrent glioblastoma as a prognostic factor in the synergistic system of the tumor microenvironment. *Neurol Int* 2023;15(2):595–608. DOI: 10.3390/neurolint15020037
36. Ковалева О.В., Грачев А.Н., Макарова Э.И. и др. Прогностическая значимость sPD-1/sPD-L1 при раке почки в зависимости от фенотипа опухолевых и стромальных клеток. *Онкоурология* 2022;18(2):17–28. DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28
37. Kovaleva O.V., Gratchev A.N., Makarova E.I. et al. Prognostic significance of sPD-1/sPD-L1 in renal cancer depending on the phenotype of tumor and stromal cells. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2022;18(2):17–28. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28
38. Kovaleva O.V., Podlesnaya P., Sorokin M. et al. Macrophage phenotype in combination with tumor microbiome composition predicts RCC patients' survival: a pilot study. *Biomedicines* 2022;10(7):1516. DOI: 10.3390/biomedicines10071516
39. Абдулжалиев А.Т., Булычева И.В., Ковалева О.В. и др. Экспрессия PD-L1 и PU.1 в злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2023;12(2). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.44-53
40. Abdulhaliev A.T., Bulycheva I.V., Kovaleva O.V. et al. Expression of PD-L1 and PU.1 in malignant tumors from the membranes of peripheral nerves. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology* 2023;12(2). (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.44-53
41. Khan S.U., Khan M.U., Azhar Ud Din M. et al. Reprogramming tumor-associated macrophages as a unique approach to target tumor immunotherapy. *Front Immunol* 2023;14:1166487. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1166487
42. Li M., Jiang P., Wei S. et al. The role of macrophages-mediated communications among cell compositions of tumor microenvironment in cancer progression. *Front Immunol* 2023;14:1113312. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1113312
43. Wang L.X., Zhang S.X., Wu H.J. et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* 2019;106(2):345–58. DOI: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR
44. Martin-Manso G., Galli S., Ridnour L.A. et al. Thrombospondin 1 promotes tumor macrophage recruitment and enhances tumor cell cytotoxicity of differentiated U937 cells. *Cancer Res* 2008;68(17):7090–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0643
45. Shikanai S., Yamada N., Yanagawa N. et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage-related markers in patients with adenocarcinoma of the lung. *Ann Surg Oncol* 2023;30(12):7527–37. DOI: 10.1245/s10434-023-13384-9
46. Li J., Li L., Li Y. et al. Tumor-associated macrophage infiltration and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Int J Colorectal Dis* 2020;35(7):1203–10. DOI: 10.1007/s00384-020-03593-z
47. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoilova D.V. et al. Immunosuppressive phenotype of esophagus tumors stroma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2020;2020:5424780. DOI: 10.1155/2020/5424780
48. El-Zayat S.R., Sibai H., Mannaa F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 2019;43(1):187. DOI: 10.1186/s42269-019-0227-2
49. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 2014;5:614. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00614

48. Zhao X., Zhao J., Li D. et al. Akkermansia muciniphila: a potential target and pending issues for oncotherapy. *Pharm Res* 2023;196:106916. DOI: 10.1016/j.phrs.2023.106916
49. Xu S., Xiong Y., Fu B. et al. Bacteria and macrophages in the tumor microenvironment. *Front Microbiol* 2023;14:1115556. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1115556
50. Zhou D., Li Y. Gut microbiota and tumor-associated macrophages: potential in tumor diagnosis and treatment. *Gut Microbes* 2023;15(2):2276314. DOI: 10.1080/19490976.2023.2276314
51. Albina J.E., Reichner J.S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(1):39–53. DOI: 10.1023/a:1005904704618
52. De Groot J.W., De Weger R.A., Vandebruijn R.J., Den Otter W. Differences in the induction of macrophage cytotoxicity by the specific T lymphocyte factor, specific macrophage arming factor (SMAF), and the lymphokine, macrophage activating factor (MAF). *Immunobiology* 1989;179(2–3):131–44. DOI: 10.1016/s0171-2985(89)80012-9
53. Reis E.S., Mastellos D.C., Ricklin D. et al. Complement in cancer: untangling an intricate relationship. *Nat Rev Immunol* 2018;18(1):5–18. DOI: 10.1038/nri.2017.97
54. Watkins S.K., Li B., Richardson K.S. et al. Rapid release of cytoplasmic IL-15 from tumor-associated macrophages is an initial and critical event in IL-12-initiated tumor regression. *Eur J Immunol* 2009;39(8):2126–35. DOI: 10.1002/eji.200839010
55. Weiskopf K., Weissman I.L. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 2015;7(2):303–10. DOI: 10.1080/19420862.2015.1011450
56. Gogesch P., Dudek S., van Zandbergen G. et al. The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. *Int J Mol Sci* 2021;22(16):8947. DOI: 10.3390/ijms22168947
57. Hubert P., Amigorena S. Antibody-dependent cell cytotoxicity in monoclonal antibody-mediated tumor immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012;1(1):103–5. DOI: 10.4161/onci.1.1.17963
58. Zahavi D., AlDeghaither D., O'Connell A., Weiner L.M. Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a strategy for improving antibody-based immunotherapy. *Antib Ther* 2018;1(1):7–12. DOI: 10.1093/abt/tby002
59. Zhang X., Mosser D.M. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* 2008;214(2):161–78. DOI: 10.1002/path.2284
60. Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T. et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999;189(9):1363–72. DOI: 10.1084/jem.189.9.1363
61. Meireson A., Devos M., Brochez L. IDO expression in cancer: different compartment, different functionality? *Front Immunol* 2020;11:531491. DOI: 10.3389/fimmu.2020.531491
62. Wang X., Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin* 2008;29(11):1275–88. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x
63. Das A., Monteiro M., Barai A. et al. MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. *Sci Rep* 2017;7(1):14219. DOI: 10.1038/s41598-017-14340-w
64. El-Kenawi A., Ruffell B. Inflammation, ROS, and mutagenesis. *Cancer Cell* 2017;32(6):727–9. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.11.015
65. Liu J., Geng X., Hou J., Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):389. DOI: 10.1186/s12935-021-02089-2
66. Podlesnaya P.A., Kovaleva O.V., Petrenko A.A., Gratchev A.N. Cytotoxic activity of macrophages as a tumor malignancy factor. *Bull Exp Biol Med* 2022;174(1):147–51. DOI: 10.1007/s10517-022-05664-3
67. Kovaleva O.V., Podlesnaya P.A., Vasileva M.V. et al. Transcriptome of lung cancer cells resistant to the cytotoxic activity of macrophages. *Dokl Biochem Biophys* 2022;507(1):312–7. DOI: 10.1134/S160767292205009X
68. Kainulainen K., Takabe P., Heikkinen S. et al. M1 Macrophages induce protumor inflammation in melanoma cells through TNFR-NF-kappaB signaling. *J Invest Dermatol* 2022;142(11):3041–51e10. DOI: 10.1016/j.jid.2022.04.024
69. Sharen G., Cheng H., Hu X. et al. M1-like tumor-associated macrophages enhance proliferation and anti-apoptotic ability of liver cancer cells via activating the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Med Rep* 2022;26(5):331. DOI: 10.3892/mmr.2022.12847
70. Zhou Y., Xia L., Liu Q. et al. Induction of pro-inflammatory response via activated macrophage-mediated NF-kappaB and STAT3 pathways in gastric cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 2018;47(4):1399–410. DOI: 10.1159/000490829
71. Lv C., Li S., Zhao J. et al. M1 macrophages enhance survival and invasion of oral squamous cell carcinoma by inducing GDF15-mediated ErbB2 phosphorylation. *ACS Omega* 2022;7(13):11405–14. DOI: 10.1021/acsomega.2c00571

Вклад авторов

О.В. Ковалева: обзор литературы по теме статьи, проведение системного анализа, редактирование;
М.А. Рашидова, В.В. Синева, О.С. Малащенко: анализ данных литературы, написание текста статьи;
А.Н. Грачев: написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала.

Authors' contributions

O.V. Kovaleva: literature review on the topic of the article, system analysis, editing;
M.A. Rashidova, V.V. Sinev, O.S. Malashenko: analysis of literature data, article writing;
A.N. Gratchev: article writing, preparing the illustrative material.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.В. Ковалева / O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
М.А. Рашидова / M.A. Rashidova: <https://orcid.org/0000-0002-3267-4232>
В.В. Синева / V.V. Sinyov: <https://orcid.org/0000-0001-5105-5763>
О.С. Малащенко / O.S. Malashenko: <https://orcid.org/0009-0006-7262-990X>
А.Н. Грачев / A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-15-00356; https://rscf.ru/prjcard_int?24-15-00356).
Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-15-00356; https://rscf.ru/prjcard_int?24-15-00356).

Статья поступила: 03.02.2025. **Принята к публикации:** 21.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 03.02.2025. **Accepted for publication:** 21.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-41-52>

Валидация тест-системы на основе высокопроизводительного секвенирования для детектирования микросателлитной нестабильности в образцах колоректального рака

А.А. Лебедева^{1,2}, А.Н. Тараскина¹, А.И. Кавун¹, Е.В. Белова^{1,2}, Т.В. Григорьева^{1,2}, О.А. Кузнецова^{1,3}, Д.А. Кравчук⁴, Л.Д. Беляева², В.Э. Никулин³, Е.Д. Хоменко¹, В.А. Милейко^{1,2}, А.А. Трякин³, М.Ю. Федянин³⁻⁵, М.В. Иванов^{1,2}

¹ООО «ОнкоАтлас»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-кт, 4, стр. 1А;

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

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴ГБУЗ г. Москвы «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 108814 Москва, пос. Сосенское, пос. Коммунарка, Сосенский Стан, 8, стр. 3;

⁵ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 105203 Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70

Контакты: Александра Артемовна Лебедева lebedeva_a_a_1@staff.sechenov.ru

Введение. На сегодняшний день в рутинной клинической практике для определения микросателлитной нестабильности (MSI) и дефицита репарации ошибочно спаренных оснований (dMMR) используют стандартные методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) или иммуногистохимического исследования. Выявление MSI с помощью метода высокопроизводительного секвенирования (секвенирования нового поколения – next generation sequencing, NGS) представляет особый интерес в связи с возможностью анализа большого количества микросателлитов, а также одновременного исследования альтераций в терапевтически значимых генах.

Цель исследования – валидация ампликонной NGS-панели для анализа MSI и альтераций в генах, клинически значимых при колоректальном раке.

Материалы и методы. Высокопроизводительное секвенирование для анализа MSI проводилось на фиксированных в формалине и залитых парафином (FFPE) образцах пациентов с колоректальным раком всех стадий с использованием ампликонной панели «Соло-тест Драйвер» (Россия), охватывающей 38 генов и 39 коротких tandemных повторов (моноклеотидов). В качестве референсного метода применяли ПЦР по 5 локусам (BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27). В ходе NGS MSI оценивали на основе распределения к-меров. Статистический анализ проводили с использованием коэффициента каппа Козна (κ), U-критерия Манна–Уитни и точного теста Фишера.

Результаты. Разработана ампликонная NGS-панель для анализа MSI в 39 локусах, а также альтераций в 39 генах, которая провалидирована на 160 архивных FFPE-образцах колоректального рака. По результатам ПЦР 42 (26,25 %) образца оказались MSI-положительными, 118 (73,75 %) – MSI-отрицательными. Результаты ПЦР и NGS были конкордантными в 98,75 % (158/160) случаев.

Заключение. Коэффициент κ составил 0,97, что свидетельствует о высокой конкордантности анализа MSI с помощью ПЦР и разработанной тест-системы на основе NGS.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, секвенирование нового поколения, микросателлитная нестабильность

Для цитирования: Лебедева А.А., Тараскина А.Н., Кавун А.И. и др. Валидация тест-системы на основе высокопроизводительного секвенирования для детектирования микросателлитной нестабильности в образцах колоректального рака. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):41–52.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-41-52>

Validation of high-throughput sequencing-based test system for detection of microsatellite instability in colorectal cancer samples

A.A. Lebedeva^{1,2}, A.N. Taraskina¹, A.I. Kavun¹, E.V. Belova^{1,2}, T.V. Grigor'eva^{1,2}, O.A. Kuznetsova^{1,3}, D.A. Kravchuk⁴, L.D. Belyaeva², V.E. Nikulin³, E.D. Khomenko¹, V.A. Mileyko^{1,2}, A.A. Tryakin³, M.Yu. Fedyanin³⁻⁵, M.V. Ivanov^{1,2}

¹ LLC OncoAtlas; Bld. 4, 1A Leninsky Prospekt, Moscow 119049, Russia;

² Sechenov University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

⁴ Moscow Multidisciplinary Clinical Center "Kommunarka", Moscow Healthcare Department; Bld. 3, 8 Sosenskiy Stan, Kommunarka Sosenskoye, Moscow 108814, Russia;

⁵ N.I. Pirogov National Medical and Surgical Center, Ministry of Health of Russia; 70 Nizhnyaya Pervomayskaya St., Moscow 105203, Russia

Contacts: Alexandra Artemovna Lebedeva lebedeva_a_a_1@staff.sechenov.ru

Introduction. Currently in routine clinical practice, standard methods based on polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemical examination are used to determine microsatellite instability (MSI) and deficient mismatch repair system (dMMR). MSI identification using high-throughput sequencing (next generation sequencing, NGS) is of special interest because it allows to analyze a large number of microsatellites and simultaneously study alterations in therapeutically significant genes.

Aim. To validate of amplicon-based NGS panel for analysis of MSI and alterations in clinically significant genes in colorectal cancer.

Materials and methods. High-throughput sequencing for MSI analysis was performed on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from patients with colorectal cancer of any stage using amplicon-based panel "Solo-test Driver" (Russia) which covers 38 genes and 39 short tandem repeats (mononucleotides). As a reference method, 5-loci (BAT25, BAT26, NR21, NR24 and NR27) PCR was used. In NGS, MSI was evaluated based on kmer distribution. Statistical analysis was performed using Cohen's kappa (κ), Mann-Whitney U test, and Fisher's exact test.

Results. An amplicon-based NGS panel for analysis of MSI in 39 loci and alterations in 39 genes was developed and validated on 160 archival FFPE samples of colorectal cancer. Per PCR, 42 (26.25 %) samples were MSI-positive, 118 (73.75 %) were MSI-negative. The results of PCR and NGS were concordant in 98.75 % (158/160) cases.

Conclusion. The κ coefficient was 0.97 which demonstrates high concordance of MSI analyses using PCR and the developed NGS-based assay system.

Keywords: high-throughput sequencing, next generation sequencing, microsatellite

For citation: Lebedeva A.A., Taraskina A.N., Kavun A.I. et al. Validation of high-throughput sequencing-based test system for detection of microsatellite instability in colorectal cancer samples. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):41–52. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-41-52>

ВВЕДЕНИЕ

Микросателлитная нестабильность (MSI) представляет собой накопление мутаций в микросателлитах — коротких tandemных повторах (STR), состоящих из многочисленных повторяющихся 1–6 нуклеотидных последовательностей. Такие мутации обычно приводят к изменению длины повторов и отражают нарушение работы системы репарации ошибочных спариваний (MMR) [1–4].

Микросателлитная нестабильность является важным предиктивным биомаркером эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [5]. Препараты, относящиеся к этим ингибиторам, одобрены в России и за рубежом для лечения пациентов с солидными опухолями при условии положительного MSI-статуса.

Рутинным методом оценки MSI является полимеразная цепная реакция (ПЦР), в то время как оценка дефицита репарации ошибочно спаренных оснований (dMMR) проводится с помощью иммуногистохими-

ческого (ИГХ) исследования с 4 антителами. В настоящее время они широко используются в клинических условиях и рекомендованы профессиональными сообществами [6]. Несмотря на широкое применение, относительно дешевизну и простоту применения, рутинные методы имеют и ряд недостатков [7]. В частности, при использовании ИГХ-анализа могут наблюдаться спорные результаты, поскольку не всегда потеря функции одного из белков синдрома Линча (MLH1, PMS2, MSH2 и MSH6) ведет к развитию MSI. Помимо этого, часты и ложноотрицательные результаты ИГХ-исследования (отсутствие dMMR — pMMR), обусловленные наличием миссенс-вариантов генов MMR, что приводит к экспрессии нефункционирующих белков с сохраненной способностью связываться антителом. Ложноположительные результаты ИГХ-анализа отмечаются в 5–11 % случаев [1, 8].

В свою очередь, ПЦР позволяет оценить нестабильность только определенных микросателлитов: либо BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123 и D17S250

в панели Bethesda, либо пяти поли-А-моонуклеотидных повторов BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 и NR-27 [9, 10]. Использование существующих тест-систем ПЦР связано с рядом ограничений [11]. Так, при низкой клеточности опухоли ($\leq 20\%$) результаты ПЦР могут быть недостоверными [12, 13]. В некоторых случаях в связи с популяционным полиморфизмом анализируемых STR наблюдаются ложноположительные результаты [14]. Таким образом, определение MSI при колоректальном раке (КРР) с использованием ПЦР может быть затруднено. Кроме того, применимость данных панелей в случае других солидных опухолей остается дискуссионной из-за предполагаемых различий в локусах MSI между КРР и другими типами новообразований [15–19].

Высокопроизводительное секвенирование (секвенирование нового поколения, next generation sequencing (NGS)) является относительно новым методом, позволяющим расширить диапазон анализируемых маркеров MSI [6]. Возросший спрос на тестирование MSI и требования высокой точности и органоспецифичности привели к пересмотру стандартов, методов и интерпретации результатов, а также к разработке новых подходов к определению MSI. Одним из наиболее многообещающих среди них считается NGS из-за его преимуществ, включая высокую точность, расширенный спектр анализируемых микросателлитов и одновременную оценку полного спектра клинически значимых маркеров, таких как высокая мутационная нагрузка и альтерации в таргетируемых мишенях [6, 20]. Анализ MSI с помощью NGS особенно перспективен для спектра опухолей неколоректальной нозологии, вероятно, содержащих опухолеспецифичный набор локусов микросателлитов, которые могут быть нестабильны [21, 22]. Кроме того, подходы с использованием данного метода позволяют проводить анализ по жидкостной биопсии, что способствует решению проблемы доступности опухолевого материала, актуальной для своевременного принятия клинического решения и мониторинга ответа на терапию [23, 24].

Цель исследования — валидация тест-системы NGS для детектирования MSI в образцах КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы. Проанализированы архивные фиксированные в формалине и заключенные в парафин (FFPE) образцы пациентов с КРР всех стадий. Проведено исследование MSI с использованием NGS и ПЦР с последующим фрагментным анализом.

Полимеразная цепная реакция с последующим фрагментным анализом. В качестве «золотого стандарта» определения MSI выбрана ПЦР с последующим фрагментным анализом с использованием панели, позволяющей анализировать 5 локусов: BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27. Наличие MSI определяли во всех образцах.

Интерпретацию результатов проводили согласно международным клиническим руководствам [6].

Всего с помощью разработанной тест-системы на основе NGS и референсного метода ПЦР проанализированы 168 FFPE-образцов, полученных от пациентов с КРР. В 56,9 % случаев локализация опухоли была левосторонней. Не прошли контроль качества и были исключены из дальнейшего анализа 8 проанализированных образцов.

Клинико-морфологическая характеристика пациентов, образцы которых были проанализированы с использованием высокопроизводительного секвенирования и ПЦР, представлена в табл. 1.

Высокопроизводительное секвенирование. Перед выделением ДНК проведено патоморфологическое исследование каждого образца в целях оценки пригодности материала для молекулярно-генетического исследования и выбора наиболее подходящего блока. Определяли общее количество опухолевых клеток и их распределение в образце, наличие очагов некроза, а также преаналитические нарушения.

ДНК выделена из FFPE-блоков с использованием набора ExtractDNA FFPE (ООО «Номотек», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Контроль качества анализа включал оценку концентраций выделенной ДНК ($\leq 0,5$ нг/мкл) и ДНК-библиотек ($\leq 0,6$ нг/мкл, что соответствует 4 нмоль при средней длине библиотеки 267 н.п.). В случае низкой концентрации ДНК (от 0,5 до 1,5 нг/мкл) количество циклов ПЦР увеличивалось до 21. При низкой концентрации ДНК-библиотеки (от 0,3 до 0,6 нг/мкл) возможность дальнейшего секвенирования определялась в частном порядке (с учетом уровня ДНК, а также процента опухолевых клеток и доли некроза, выявленных в ходе патоморфологического исследования исходного образца). Целевое количество прочтений на образец с низкой концентрацией библиотеки увеличивалось минимум до 2,5 млн, что соответствует среднему покрытию 5000х. Концентрации выделенной ДНК и готовых библиотек определяли с помощью флуориметра Fluo-200 (AllSheng, Китай) с использованием набора для измерения концентрации двухцепочечной ДНК Equalbit 1 $\times$ dsDNA HS Assay Kit (Vazyme, Китай). Секвенирование проводилось на приборах FASTASeq300 и Genolab M (GeneMind, Китай).

Приготовление NGS-библиотек проводилось с обогащением целевых регионов методом амплификации с использованием тест-системы «Соло-тест Драйвер» (ООО «ОнкоАтлас», Россия), позволяющей анализировать альтерации (включая однонуклеотидные замены, небольшие (до 40 н.п.) вставки/делеции, а также варианты числа копий генов) 39 генов (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *ALK*, *ARAF*, *BRAF*, *CYP2D6*, *DPYD*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ESR1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *G6PD*, *H3-3A*, *H3C2*, *H3C3*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *POLE*, *PDGFRA*, *PIK3CA*,

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика пациентов, образцы которых проанализированы с использованием высокопроизводительного секвенирования и полимеразной цепной реакции

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients samples of which were analyzed using next-generation sequencing and polymerase chain reaction

Показатель Parameter	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)
Стадия: Stage:	
I	8 (5)
II	20 (12,5)
III	48 (30)
IV	80 (50)
нет информации no data	4 (2,5)
T-стадия: T-stage:	
T1	4 (2,5)
T2	10 (6,3)
T3	107 (66,9)
T4	35 (21,9)
нет информации no data	4 (2,5)
N-стадия: N-stage:	
N0	36 (22,5)
N1	70 (43,8)
N2	48 (30)
N3	1 (0,6)
Nx или нет информации Nx or no data	5 (3,1)
M-стадия: M-stage:	
M0	74 (46,3)
M1	80 (50)
Mx или нет информации Mx or no data	6 (3,8)
Локализация опухоли: Tumor localization:	
левосторонняя left-sided	91 (56,9)
правосторонняя right-sided	25 (15,6)
прямая кишка rectum	35 (21,9)
прямая кишка и левосторонняя rectum and left-sided	3 (1,9)
нет информации no data	6 (3,8)

PTEN, RAC1, RAF1, RIT1, ROS1, STK11, TP53, UGT1A1). Помимо этого, тест-система обеспечивает анализ последовательности 71 STR, что позволяет проводить анализ MSI. В дальнейшем для оценки MSI отобраны 39 STR на основании данных литературы и публичных репозиториев. Все отобранные STR были мононуклеотидными (табл. 2).

Таблица 2. Список коротких tandemных повторов, отобранных для анализа микросателлитной нестабильности

Table 2. List of short tandem repeats selected for microsatellite instability analysis

Позиция в геноме Genomic coordinates	Единица повтора Repeating unit	Длина повтора (п.н.) Repeat length (b.p.)
chr10:28872498-28872543	A	16
chr12:104077126-104077160	A	16
chr12:110834049-110834072	A	18
chr12:21791426-21791458	A	15
chr12:76763106-76763202	A	13
chr12:85285938-85285982	A	17
chr12:91372059-91372072	A	16
chr13:21370412-21370483	A	13
chr13:28133972-28134054	A	15
chr13:31722638-31722684	A	17
chr14:89087296-89087363	A	17
chr14:92441143-92441174	A	13
chr16:18882675-18882723	A	15
chr16:47399687-47399721	T	16
chr17:19314936-19314973	T	18
chr17:71223438-71223458	A	13
chr2:62063111-62063146	A	17
chr22:29696485-29696505	T	16
chr3:108224701-108224764	A	15
chr6:142691968-142692014	T	17
chr6:157495966-157495975	T	14
chr6:25426658-25426723	T	17
chr6:44216556-44216642	T	11
chr7:1787537-1787618	A	17
chr1:47123914-47123989	A	15
chr8:103287864-103287920	A	13
chr1:234601476-234601541	A	19
chr1:54395692-54395735	A	18
chr11:106695527-106695557	T	12
chr14:51348299-51348333	T	17
chr2:120404644-120404687	T	14
chr7:138434081-138434163	A	14
chr9:133498245-133498307	A	15
chr1:201754428-201754498	T	17
chr11:59368235-59368293	A	16
chr3:196088826-196088882	A	16
chr5:172421776-172421849	T	15
chr6:32147305-32147379	T	13
chr7:105122908-105122967	A	16

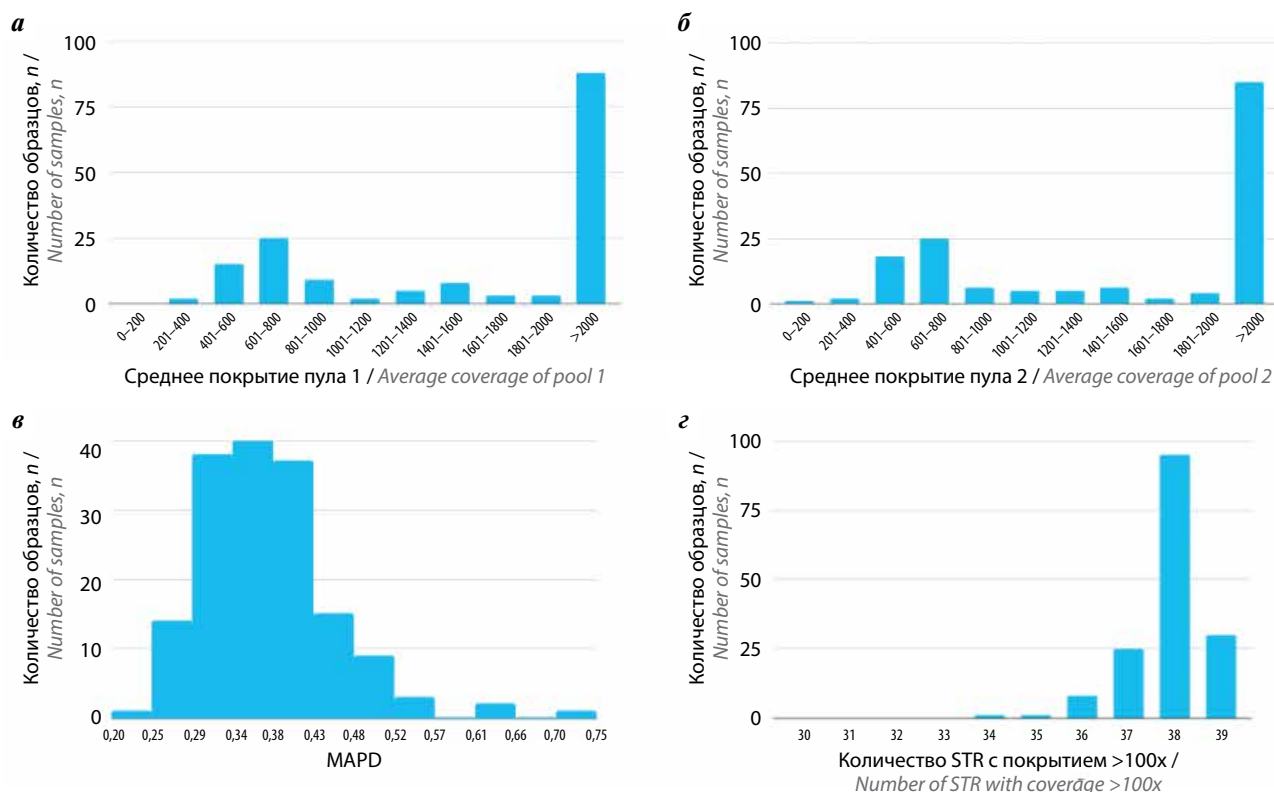


Рис. 1. Качество данных секвенирования 160 архивных образцов пациентов с колоректальным раком, включая среднее покрытие каждого пула (а, б), равномерность (MAPD) (в) и распределение количества коротких tandemных повторов (STR) с покрытием >100x (г)

Fig. 1. Sequencing data quality of 160 archived colorectal cancer patient samples, including (A, B) mean coverage of each pool (a, б), median absolute pairwise difference (MAPD) (в), and distribution of the number of short tandem repeats (STRs) with >100x coverage (г)

Анализ данных секвенирования проводили с помощью программного обеспечения Solo AVES (ООО «ОнкоАтлас», Россия). Биоинформатический контроль качества включал оценку глубины покрытия (среднее покрытие, как и покрытие каждого отдельного пула, $\leq 200\times$), равномерности (median absolute pairwise difference (MAPD) $\leq 1,00$ для каждого отдельного пула), а также покрытие каждого STR (≤ 34 регионов STR с покрытием $\leq 100\times$). Анализ MSI выполняли на основе перепредставленности к-меров, соответствующих укороченным длинам каждого региона STR (короче на 2 н.п. и более по сравнению с референсным значением) с последующим исключением перепредставленных к-меров, которые встречаются в 2 % и более достоверно стабильных образцов (данные секвенирования 100 образцов — референсный набор образцов — с подтвержденным MSI-отрицательным статусом, использованных для разработки метода анализа). Затем проводили суммирование перепредставленности (в долях от общего количества к-меров для конкретного STR) по всем STR. Итоговая сумма была определена как MSI-скор. При превышении MSI-скором порогового значения (определенного по значениям MSI-скорам референсного набора образцов как среднее значение + 5 стандартных отклонений) образец интерпретировали как MSI, в ином случае образец

интерпретировали как микросателлитную стабильность (MSS).

В качестве метода сравнения оценки MSI использовался алгоритм MSI Sensor Pro [25]. Он оценивает MSI как процент нестабильных микросателлитов в образце. Для этого используется модель мультиномиального распределения, позволяющая определить вероятность проскальзывания полимеразы с учетом распределения длин повторов, наблюдаемого в непарных стабильных образцах.

Статистический анализ. Для анализа конкордантности результатов ПЦР и NGS использовали коэффициенты каппа Коэна (κ). Разницу между MSS- и MSI-образцами исследовали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни и точного теста Фишера. При $p < 0,05$ разница считалась статистически значимой.

Мутационную нагрузку (TMB) рассчитывали как количество мутаций на 1 Мб. При подсчете не учитывали активирующие мутации, а также мутации с частотой $< 10\%$ максимальной частоты активирующих мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* и *TP53* или $< 2,5\%$ максимальной частоты активирующих мутаций в остальных генах. Для значения TMB рассчитывали 95 % доверительный интервал с помощью биномиального распределения. Сравнение групп MSI/MSS проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конкордантность NGS и ПЦР в отношении детектирования микросателлитной нестабильности. Средняя концентрация ДНК для всех образцов составила 30,8 нг/мкл (медиана 7,1 (0,76–3181) нг/мкл), средняя концентрация библиотеки – 20,6 нг/мкл (медиана 22,7 (0,39–44,8) нг/мкл). Доля опухолевых клеток в материале, исследованном методом ПЦР, составила 10–80 %, в материале, проанализированном с помощью NGS, – 5–80 %. Медиана среднего покрытия всех образцов оказалась равной 2352х (диапазон 238–28447х), MAPD – 0,368 (диапазон 0,236–0,731). В 58,7 % образцов 38 из 39 проанализированных STR имели покрытие, превышающее 100х. При этом минимальное количество STR с таким покрытием составило 33 (рис. 1).

Все образцы, успешно прошедшие контроль качества, протестированы на наличие MSI с использо-

ванием разработанной NGS-тест-системы и ПЦР в качестве референсного метода. По результатам ПЦР 42 (26,25 %) образца оказались MSI-положительными, 118 (73,75 %) – MSI-отрицательными. По результатам NGS в 40 (25 %) образцах выявлена MSI, 120 (75 %) были MSI-отрицательными (табл. 3). Результаты ПЦР и NGS оказались конкордантными в 98,75 % (158/160) случаев. Таким образом, коэффициент конкордантности составил 0,97. Специфичность разработанной тест-системы в определении MSI достигла 100 % (96,92–100 %), прогностическая ценность положительного результата MSI (PPV) – 100 % (91,19–100 %) (табл. 4).

Расширенные результаты NGS. В ходе NGS-исследования получена информация о наличии генетических вариантов и вариантов числа копий в проанализированных генах (рис. 2). В 149 (93,1 %) образцах обнаружен как минимум 1 генетический вариант.

Таблица 3. Соответствие результатов высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) (n = 160)

Table 3. Concordance next generation sequencing (NGS) and polymerase chain reaction (PCR) results. A total of 160 samples were analyzed using both methods (n = 160)

Показатель Parameter	ПЦР MSI, n (%) PCR MSI, n (%)	ПЦР MSS, n (%) PCR MSS, n (%)
NGS MSI	40 (25)	0
NGS MSS	2 (1,25)	118 (73,75)

Примечание. MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность.

Note. MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability.

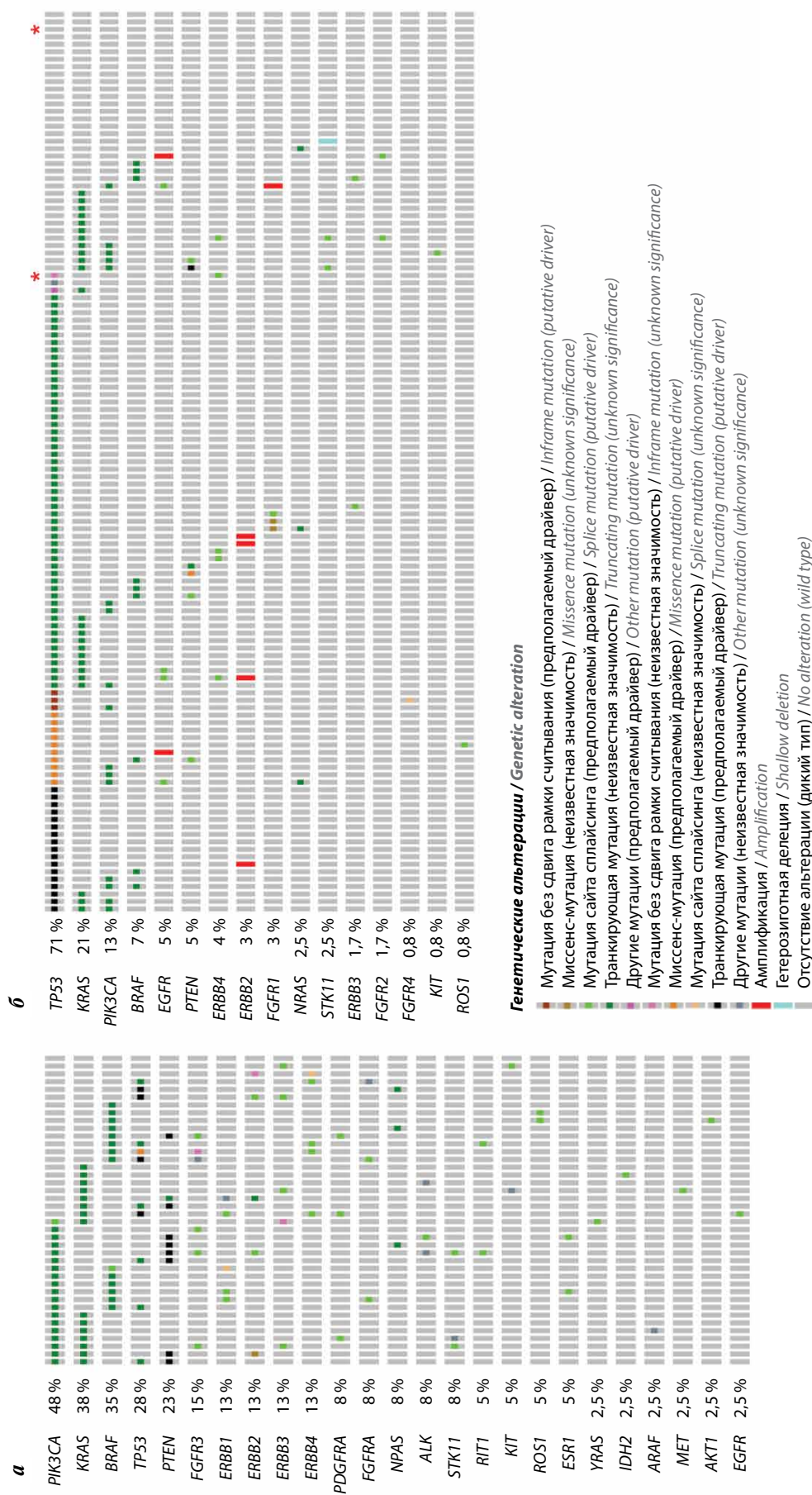
Таблица 4. Аналитические характеристики NGS-тест-системы

Table 4. Analytical characteristics of the NGS test system

Показатель Parameter	Значение Value
Чувствительность (95 % ДИ) Sensitivity (95 % CI)	95,24 % (83,84–99,42 %)
Специфичность (95 % ДИ) Specificity (95 % CI)	100 % (96,92–100 %)
PPA (95 % ДИ) PPA (95 % CI)	100 % (91,19–100 %)
NPA (95 % ДИ) NPA (95 % CI)	98,33 % (93,85–99,56 %)
Точность (95 % ДИ) Accuracy (95 % CI)	98,75 % (95,56–99,85 %)
Конкордантность (κ) Concordance (κ)	0,97

Примечание. ДИ – доверительный интервал; NGS – высокопроизводительное секвенирование (секвенирование нового поколения); PPA – положительное согласие; NPA – отрицательное согласие.

Note. CI – confidence interval; NGS – next generation sequencing; PPA – positive percent agreement; NPA – negative percent agreement.



*Образцы, для которых получены дискордантные результаты полимеразной цепной реакции и NGS (ложноотрицательные образцы) /
 *Samples for which discordant polymerase chain reaction and NGS results were obtained (false negative samples)

Рис. 2. Встречаемость альтераций в различных генах в образцах, определенных как MSI-положительные (MSI – микросателлитная нестабильность) (а) и MSI-отрицательные (б) по результатам высокопроизводительного секвенирования (секвенирования нового поколения) (next-generation sequencing, NGS)

Fig. 2. Frequency of alterations in different genes in samples defined as MSI-positive (MSI – microsatellite instability) (а) or MSI-negative (б) based on next-generation sequencing (NGS) analysis

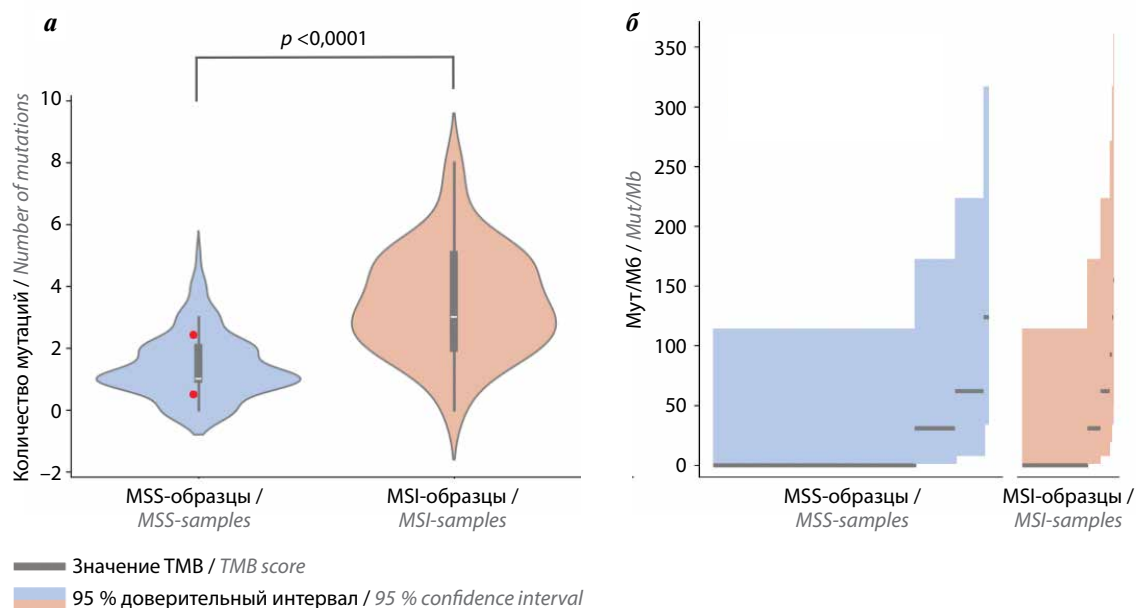


Рис. 3. Количество мутаций (а) и мутационная нагрузка (TMB) (б) в MSI- и MSS-образцах. Красными точками указано количество мутаций в образцах, MSI-статус которых различался по результатам высокопроизводительного секвенирования и полимеразной цепной реакции. MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность

Fig. 3. Number of mutations (a) and tumor mutational burden (TMB) (b) observed in MSI or MSS samples. Red dots show the number of mutations in samples with discordant MSI status according to next-generation sequencing and polymerase chain reaction. MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability

В 19 (11,9 %) образцах выявлен вариант *BRAF*^{p.V600E}, 13 из них оказались MSI-положительными на основании результатов как NGS, так и ПЦР. Количество мутаций в MSI-положительных образцах пациентов было значительно выше, чем в MSI-отрицательных (медиана 3 против 1; $p < 0,0001$). Максимальное количество мутаций в MSI-образцах составило 8, в MSS-образцах – 5 (рис. 3, а). Мутационная нагрузка в MSI-положительных образцах была статистически значимо выше, чем в MSI-отрицательных (медиана 61,9 мут/Мб против 0 мут/Мб; $p < 0,05$) (рис. 3, б).

Симуляция смешивания образцов. Для оценки робастности методологии оценки MSI с использованием разработанной NGS-тест-системы, а также оценки аналитической чувствительности (определения минимальной доли опухолевых клеток в образце, при которой достоверно детектируется MSI) проведено *in silico* смешивание данных секвенирования для достижения ожидаемой доли опухолевого образца. Для этого выбраны 11 пациентов с MSI-опухолями, по которым имелись данные секвенирования опухолевого материала и секвенирования другого вида биологического материала (не-FFPE).

In silico эксперимент проводился путем случайной выборки чтений из данных секвенирования опухолевого материала и их прямого смешения со случайной выборкой чтений из данных секвенирования материала не-FFPE. Смешение выполнялось с расчетом, что отношение чтений из данных секвенирования опухолевого материала к общему количеству чтений в образце *in silico* должно соответствовать заданной

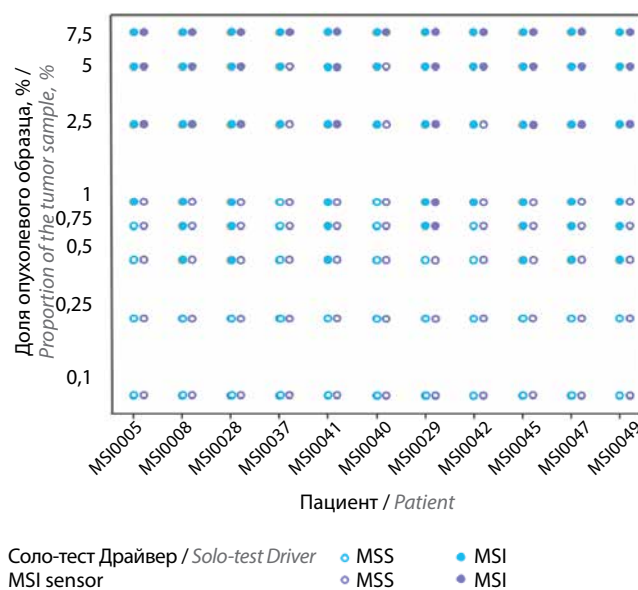


Рис. 4. Результаты сравнения аналитической чувствительности тест-системы по данным *in silico* смешивания MSI- и MSS-образцов и по данным, полученным с помощью алгоритма MSI Sensor. Эксперимент проводили с использованием 22 образцов, полученных от 11 пациентов с ранее верифицированным по опухолевому образцу MSI-статусом. Для всех образцов определен MSI-статус по каждой представленной доли опухолевых клеток. MSI – микросателлитная нестабильность; MSS – микросателлитная стабильность

Fig. 4. Analysis of the analytical sensitivity of the test system based on *in silico* data of mixing MSI and MSS samples and comparison with the MSI Sensor algorithm. The experiment was conducted using 22 samples from 11 patients with MSI status verified by the tumor sample. For each sample, the MSI status was determined for each represented proportion of tumor cells. MSI – microsatellite instability; MSS – microsatellite stability

заранее доле опухолевого материала в итоговом образце (диапазон доли опухолевого материала — от 0—1 до 7 %). Минимальная доля опухолевого образца, при которой определялась MSI как минимум в одном образце, составила 0,5 %: при этой доле опухолевого образца 6 (54,6 %) образцов определены как MSI-положительные. При доле опухолевого образца 0,75 % в 7 (63,4 %) образцах выявлена MSI, при доле 1 % — в 9 (81,8 %). Начиная с доли опухолевого образца в 2,5 %, MSI достоверно определялась в 100 % образцов (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

С развитием прецизионной онкологии все большее количество мишеней требует рутинного анализа в клинической практике. NGS является перспективным методом для одновременного анализа множества нарушений, включая MSI.

В настоящее время анализ MSI с использованием NGS не является стандартом в российской клинической практике. В то же время различные широко валидированные NGS-тест-системы и стандартные методы выявления dMMR/MSI демонстрируют высокую конкордантность. Так, активно применяемая гибридационная NGS-панель FoundationOne CDx (Foundation Medicine, США) продемонстрировала 97 % конкордантность при сравнении с ИГХ-исследованием и ПЦР при анализе различных солидных опухолей: в 65 из 67 образцов наблюдалась сходимость методов [26]. Другая панель — NovoPM-MSI (Novogene, Китай) — показала 97,1 % конкордантность при сравнении со стандартными методами в ходе анализа 113 образцов, полученных от пациентов с KPP [27]. Еще одна гибридационная панель — TruSight Oncology 500 (Illumina, США) — продемонстрировала 100 % конкордантность при сравнении с ПЦР при различных солидных опухолях, однако выборка была ограниченной и включала только 6 MSI-образцов [28]. Для небольших ампликонных панелей, разработанных в исследовательских целях, и ПЦР также характерна высокая конкордантность. Так, в работах K. Zheng и соавт. и C. Gan и соавт. при анализе образцов KPP конкордантность этих методов составила 100 % [29, 30]. В исследовании Y. Hirotsu и соавт. чувствительность NGS-панели при сравнении с ПЦР и ИГХ-методом оказалась равной 100 %, специфичность — 91,3 %, однако оценивались различные нозологии [31]. Таким образом, при анализе MSI конкордантность разработанной NGS-тест-системы и ПЦР сопоставима с конкордантностью широко применяемых для молекулярного профилирования опухолей NGS-панелей и ПЦР. Чувствительность панели «Соло-тест Драйвер» составила 95,24 (83,84—99,42) %, специфичность — 100 (96,92—100) %, конкордантность (κ) — 0,97.

Для 2 образцов получены дискордантные результаты: по данным NGS выявлена MSS, по данным ПЦР — MSI. В одном образце ложноотрицательные результаты NGS, вероятно, связаны с наличием ДНК из очагов

некроза, которая могла попасть в проанализированную ДНК. Причиной этого также может быть низкая клеточность, что подтверждается фактом невысокой частоты встречаемости альтернативного аллеля обнаруженной драйверной мутации (в образце выявлен вариант *TP53* p.Thr125Met с частотой альтернативного аллеля 1,5 %), что не характерно при анализе FFPE-материала. Так, в 95 % (38/40) MSI-образцов определены драйверные варианты с частотой более 5 %, в противовес MSS-образцам, в которых только в 79,2 % (95/120) случаев обнаружены драйверные варианты с такой частотой ($p = 0,0467$). В другом ложноотрицательном образце не выявлено ни одной соматической мутации, что не характерно для MSI-опухолей. Так, мутации в целевой последовательности не были обнаружены в 15,8 % (19/120) MSS-опухолей и 2,5 % (1/40) MSI-опухолей ($p = 0,0485$). Эти результаты могут свидетельствовать о низком качестве проанализированного материала или об отсутствии опухолевых клеток в анализируемом материале. Таким образом, все ложноотрицательные случаи могут быть объяснены этим.

Применение тест-систем на основе NGS позволяет одновременно анализировать различные альтерации в опухоли, значительно сокращая временные затраты и расход опухолевого материала. В результате нарушения работы системы MMR в опухоли накапливаются мутации, что может повысить мутационную нагрузку [6, 32, 33]. В проанализированной выборке количество мутаций, выявленных в MSI-образцах, было статистически значимо выше, чем в MSS-образцах (см. рис. 3). В 38 % MSI-опухолей обнаружены альтерации, анализ которых предписан клиническими руководствами для планирования системной терапии. В частности, в 35 % MSI-образцов выявлен вариант *BRAF*^{V600E}. Это может свидетельствовать о том, что MSI в этих образцах — результат гиперметилирования промотора *MLH1* [34, 35]. В то же время в 21 % MSS-образцов также обнаружены альтерации, анализ которых является стандартом диагностики KPP.

Одним из преимуществ оценки MSI методом NGS по сравнению со стандартными методами (ИГХ-исследованием и ПЦР) является возможность использования материала с низким содержанием опухолевых клеток, а также жидкостной биопсии. Применение NGS в отличие от стандартных методов позволяет исследовать длину большого количества STR и автоматически анализировать распределение длин повторов, что помогает исключить фактор некорректной интерпретации результатов. Полученные результаты симуляции смешивания образцов *in silico* продемонстрировали 100 % чувствительность разработанной тест-системы в отношении детектирования MSI уже при 2,5 % опухолевого материала в образце, что свидетельствует о перспективности применения тест-системы на основе NGS для анализа материала с низким содержанием опухолевых клеток. При этом при сравнении с широко используемым алгоритмом для анализа MSI продемонстрирована более высокая чувстви-

тельность тест-системы «Соло-тест Драйвер», что показывает возможность высокоточного детектирования MSI при небольшом количестве опухолевого материала или при использовании жидкостной биопсии, что является актуальным вопросом молекулярно-генетической диагностики КРР.

Ограничением данного исследования являлась относительно небольшая выборка образцов. Кроме того, для валидации панели в рамках настоящей работы использованы образцы только КРР.

Таким образом, разработанная NGS-тест-система имеет преимущества перед стандартными методами и позволяет с высокими чувствительностью, точностью и специфичностью детектировать MSI, а также

проводить одновременный анализ клинически значимых альтераций, характерных для КРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о высокой конкордантности ПЦР и разработанной NGS-тест-системы «Соло-тест Драйвер» в отношении анализа MSI. Количество мутаций в MSI-положительных образцах было значительно выше, чем в MSI-отрицательных образцах, что демонстрирует корректность полученных данных. Результаты симуляции смешивания образцов *in silico* демонстрируют, что разработанная NGS-тест-система позволяет проводить анализ MSI в образцах с низким содержанием опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Barette M., Le D.T. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther* 2018;189:45–62. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.04.004
2. Ma J., Setton J., Lee N.Y. et al. The therapeutic significance of mutational signatures from DNA repair deficiency in cancer. *Nat Commun* 2018;9(1):3292. DOI: 10.1038/s41467-018-05228-y
3. Lepore Signorile M., Disciglio V., Di Carlo G. et al. From genetics to histomolecular characterization: an insight into colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome. *Int J Mol Sci* 2021;22(13):6767. DOI: 10.3390/ijms22136767
4. Lower S.S., McGurk M.P., Clark A.G. et al. Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. *Curr Opin Genet Dev* 2018;49:70–8. DOI: 10.1016/j.gde.2018.03.003
5. Kavun A., Veselovsky E., Lebedeva A. et al. Microsatellite instability: a review of molecular epidemiology and implications for immune checkpoint inhibitor therapy. *Cancers* 2023;15(8):2288. DOI: 10.3390/cancers15082288
6. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* 2019;30(8):1232–43. DOI: 10.1093/annonc/mdz116
7. Yakushina V., Kavun A., Veselovsky E. et al. Microsatellite Instability detection: the current standards, limitations, and misinterpretations. *JCO Precis Oncol* 2023;7:e2300010. DOI: 10.1200/po.23.00010
8. Amato M., Franco R., Facchini G. et al. Microsatellite instability: from the implementation of the detection to a prognostic and predictive role in cancers. *Int J Mol Sci* 2022;23(15):8726. DOI: 10.3390/ijms23158726
9. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(4):261–8. DOI: 10.1093/jnci/djh034
10. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R. et al. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One* 2010;5(2):e9393. DOI: 10.1371/journal.pone.0009393
11. Coelho H., Jones-Hughes T., Snowsill T. et al. A systematic review of test accuracy studies evaluating molecular micro-satellite instability testing for the detection of individuals with Lynch syndrome. *BMC Cancer* 2017;17(1):836. DOI: 10.1186/s12885-017-3820-5
12. Parente P., Grillo F., Vanoli A. et al. The day-to-day practice of MMR and MSI assessment in colorectal adenocarcinoma: what we know and what we still need to explore. *Dig Dis* 2023;41(5):746–56. DOI: 10.1159/000531003
13. Ukkola I., Nummela P., Kero M., Ristimäki A. Diagnostic performance of Idylla MSI test in colorectal cancer biopsies. *Diagn Pathol* 2023;18(1):39. DOI: 10.1186/s13000-023-01328-6
14. Cohen R., Hain E., Buhard O. et al. Association of primary resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer with misdiagnosis of microsatellite instability or mismatch repair deficiency status. *JAMA Oncol* 2019;5(4):551–5. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.4942
15. Shia J. The diversity of tumours with microsatellite instability: molecular mechanisms and impact upon microsatellite instability testing and mismatch repair protein immunohistochemistry. *Histopathology* 2020;78(4):485–97. DOI: 10.1111/his.14271
16. Cortes-Ciriano I., Lee S., Park W.Y. et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 2017;8(1):15180. DOI: 10.1038/ncomms15180
17. Yang R.K., Chen H., Roy-Chowdhuri S. et al. Clinical testing for mismatch repair in neoplasms using multiple laboratory methods. *Cancers* 2022;14(19):4550. DOI: 10.3390/cancers14194550
18. Kim T.M., Laird P.W., Park P.J. The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. *Cell* 2013;155(4):858–68. DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.015
19. Kuusmanen S.A., Moisio A.L., Schweizer P. et al. Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability. *Am J Pathol* 2002;160(6):1953–8. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)61144-3
20. Gilson P., Merlin J.L., Harlé A. Detection of microsatellite instability: state of the art and future applications in circulating tumour DNA (ctDNA). *Cancers* 2021;13(7):1491. DOI: 10.3390/cancers13071491
21. Ratovomanana T., Cohen R., Svrcek M. et al. Performance of next-generation sequencing for the detection of microsatellite instability in colorectal cancer with deficient DNA mismatch repair. *Gastroenterology* 2021;161(3):814–26.e7. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.05.007
22. Lebedeva A., Belova E., Grigoreva T. et al. MSI detection by NGS using tumor samples and liquid biopsy for patients with solid tumors: a single institution experience. *Ann Oncol* 2023;34(1):1–55. DOI: 10.1016/esmoop/esmoop101646
23. Cisneros-Villanueva M., Hidalgo-Pérez L., Rios-Romero M. et al. Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review. *Br J Cancer* 2022;126(3):391–400. DOI: 10.1038/s41416-021-01696-0

24. Yu F., Makrigiorgos A., Leong K.W. et al. Sensitive detection of microsatellite instability in tissues and liquid biopsies: recent developments and updates. *Comput Struct Biotechnol J* 2021;19:4931–40. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.08.037
25. Jia P., Yang X., Guo L. et al. MSIsensor-pro: fast, accurate, and matched-normal-sample-free detection of microsatellite instability. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2020;18(1):65–71. DOI: 10.1016/j.gpb.2020.02.001
26. Trabucco S.E., Gowen K., Maund S.L. et al. A novel next-generation sequencing approach to detecting microsatellite instability and pan-tumor characterization of 1000 microsatellite instability-high cases in 67,000 patient samples. *J Mol Diagn* 2019;21(6):1053–66. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.06.011
27. Zhao L., Shan G., Li L. et al. A robust method for the rapid detection of microsatellite instability in colorectal cancer. *Oncol Letters* 2020;20(2):1982–8. DOI: 10.3892/ol.2020.11702
28. Froyen G., Geerdens E., Berden S. et al. Diagnostic validation of a comprehensive targeted panel for broad mutational and biomarker analysis in solid tumors. *Cancers* 2022;14(10):2457. DOI: 10.3390/cancers14102457
29. Zheng K., Wan H., Zhang J. et al. A novel NGS-based microsatellite instability (MSI) status classifier with 9 loci for colorectal cancer patients. *J Transl Med* 2020;18(1):215. DOI: 10.1186/s12967-020-02373-1
30. Gan C., Love C., Beshay V. et al. Applicability of next generation sequencing technology in microsatellite instability testing. *Genes* 2015;6(1):46–59. DOI: 10.3390/genes6010046
31. Hirotsu Y., Nagakubo Y., Amemiya K. et al. Microsatellite instability status is determined by targeted sequencing with MSICall in 25 cancer types. *Clinica Chimica Acta* 2020;502:207–13. DOI: 10.1016/j.cca.2019.11.002
32. Yuza K., Nagahashi M., Watanabe S. et al. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget* 2017;8(67):112103–15. DOI: 10.18632/oncotarget.22783
33. Goodman A.M., Sokol E.S., Frampton G.M. et al. Microsatellite-stable tumors with high mutational burden benefit from immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2019;7(10):1570–3. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-19-0149
34. McGivern A., Wynter C.V.A., Whitehall V.L.J. et al. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Familial Cancer* 2002;3(2):101–7. DOI: 10.1023/b:fame.0000039861.30651.c8
35. Bond C.E., Liu C., Kawamata F. et al. Oncogenic BRAF mutation induces DNA methylation changes in a murine model for human serrated colorectal neoplasia. *Epigenetics* 2018;13(1):40–8. DOI: 10.1080/15592294.2017.1411446

Вклад авторов

А.А. Лебедева: анализ данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи, редактирование;
 А.Н. Тараскина: анализ данных, редактирование;
 А.И. Кавун: написание текста статьи, редактирование;
 Е.В. Белова: систематизация данных, редактирование;
 Т.В. Григорьева, Л.Д. Беляева: подготовка материала, написание текста статьи, редактирование;
 О.А. Кузнецова, Д.А. Кравчук, В.Э. Никулин: сбор материала, редактирование;
 Е.Д. Хоменко: проведение эксперимента, редактирование;
 В.А. Милейко: курирование проекта, редактирование;
 А.А. Трякин, М.Ю. Федянин: сбор материала, курирование проекта, редактирование;
 М.В. Иванов: разработка концепции исследования, научное руководство, анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

A.A. Lebedeva: data analysis, preparation of illustrative material, article writing, editing;
 A.N. Taraskina: data analysis, editing;
 A.I. Kavun: article writing, editing;
 E.V. Belova: data systematization, editing;
 T.V. Grigor'eva, L.D. Belyaeva: preparing the material, article writing, editing;
 O.A. Kuznetsova, D.A. Kravchuk, V.E. Nikulin: collecting material, editing;
 E.D. Khomenko: conducting an experiment, editing;
 V.A. Mileyko: project supervision, editing;
 A.A. Tryakin, M.Yu. Fedyanin: collecting material, curating the project, editing;
 M.V. Ivanov: development of the research concept, scientific guidance, data analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Лебедева / A.A. Lebedeva: <https://orcid.org/0000-0003-1920-5076>
 А.Н. Тараскина / A.N. Taraskina: <https://orcid.org/0000-0003-1952-9783>
 А.И. Кавун / A.I. Kavun: <https://orcid.org/0000-0003-3861-5281>
 Е.В. Белова / E.V. Belova: <https://orcid.org/0000-0002-7701-8765>
 Т.В. Григорьева / T.V. Grigor'eva: <https://orcid.org/0000-0001-9054-1481>
 О.А. Кузнецова / O.A. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0001-7753-3081>
 Д.А. Кравчук / D.A. Kravchuk: <https://orcid.org/0000-0002-8780-6159>
 Л.Д. Беляева / L.D. Belyaeva: <https://orcid.org/0009-0007-7177-2875>
 В.Э. Никулин / V.E. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-8958-9805>
 Е.Д. Хоменко / E.D. Khomenko: <https://orcid.org/0009-0008-7852-7466>
 В.А. Милейко / V.A. Mileyko: <https://orcid.org/0000-0002-0272-1747>
 А.А. Трякин / A.A. Tryakin: <https://orcid.org/0000-0003-2245-214X>
 М.Ю. Федянин / M.Yu. Fedyanin: <https://orcid.org/0000-0001-5615-7806>
 М.В. Иванов / M.V. Ivanov: <https://orcid.org/0000-0002-9961-0129>

Конфликт интересов. А.А. Лебедева, А.Н. Тараскина, А.И. Кавун, Е.В. Белова, Т.В. Григорьева, О.А. Кузнецова, Е.Д. Хоменко, В.А. Милейко, М.В. Иванов являются сотрудниками ООО «ОнкоАтлас». Другие авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. A.A. Lebedeva, A.N. Taraskina, A.I. Kavun, E.V. Belova, T.V. Grigor'eva, O.A. Kuznetsova, E.D. Khomenko, V.A. Mileyko, M.V. Ivanov are employees of LLC "OncoAtlas". The other authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-75-10154).
Funding. The research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 22-75-10154).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of Sechenov University, Ministry of Health of Russia.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-53-60>

CNA-ландшафт HER2-негативного рака молочной железы при применении таксансодержащих схем неоадьювантной химиотерапии

М.К. Ибрагимова¹⁻³, Е.А. Кравцова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,3}, Н.В. Литвяков¹⁻⁴

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

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

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

⁴ФГБУН «Северский биофизический научный центр» Федерального медико-биологического агентства России; Россия, 636013 Северск, пер. Чекист, 7, корп. 2

Контакты: Марина Константиновна Ибрагимова imk1805@yandex.ru

Введение. Оценка того, как и когда включать таксаны в предоперационную химиотерапию, становится более актуальной в эпоху, когда молекулярно-генетический подход не только позволяет разрабатывать биологически направленные терапевтические средства, но и предполагает возможность выбора пациентов, которым будут полезны определенные цитотоксические агенты.

Цель исследования – анализ изменения CNA-генетического ландшафта (CNA – copy number aberration, aberrации числа копий) опухоли молочной железы люминального В HER2-отрицательного (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) подтипа под действием таксансодержащих схем неоадьювантной химиотерапии (НХТ) для выявления групп потенциальных CNA-маркеров объективного ответа на лечение и CNA-маркеров прогнозирования возникновения гематогенного метастазирования.

Материалы и методы. В исследование включены 28 больных раком молочной железы T1–4N0–3M0 IIA–IIIB стадии люминального В HER2-негативного подтипа в возрасте 24–67 лет (средний возраст $44,6 \pm 0,3$ года). В неоадьювантном режиме пациенты получали 4–8 курсов химиотерапии по схемам АСТ, АТ и таксотер в монорежиме. В качестве исследуемого материала использованы парные биопсийные опухолевые образцы, взятые до лечения под контролем ультразвукового исследования, а также операционный материал после неоадьювантной химиотерапии для каждого пациента. Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США). Для обработки результатов использовали программу Chromosome Analysis Suite 4.0 (Affymetrix, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты. Наличие объективного ответа наблюдалось при отсутствии в опухоли амплификаций в регионе 20q11.22 ($p = 0,003$) и при наличии амплификаций в локусе 16p13.2 ($p = 0,027$) в опухоли до лечения. В опухоли после НХТ возникновение гематогенного метастазирования наблюдалось при большем количестве амплификаций в локусе 20q13.33 ($p = 0,002$).

Заключение. Выявлены потенциальные предиктивные CNA-маркеры объективного ответа на лечение и прогностические CNA-маркеры возникновения гематогенного метастазирования при применении таксансодержащих схем неоадьювантной химиотерапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, CNA-ландшафт опухоли, таксансодержащая схема, неоадьювантная химиотерапия, aberrация числа копий, прогнозирование исхода

Для цитирования: Ибрагимова М.К., Кравцова Е.А., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. CNA-ландшафт HER2-негативного рака молочной железы при применении таксансодержащих схем неоадьювантной химиотерапии. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):53–60.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-53-60>

CNA landscape of HER2-negative breast cancer during administration of taxane-containing schemes of neoadjuvant chemotherapy

M.K. Ibragimova¹⁻³, E.A. Kravtsova^{1,2}, M.M. Tsyganov^{1,3}, N.V. Litviakov¹⁻⁴

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

²National Research Tomsk State University; 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russia;

³Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Trakt, Tomsk 634050, Russia;

⁴Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia; Bld. 2, 7 Pereulok Chekist, Seversk 636013, Russia

Contacts: Marina Konstantinovna Ibragimova imk1805@yandex.ru

Introduction. Evaluation of when and how to include taxanes in preoperative chemotherapy is becoming more important in the era when molecular and genetic approaches allow to develop biologically targeted therapeutic medications and select patients who can benefit from certain cytotoxic agents.

Aim. To analyze the use of CNA genetic landscape (CNA – copy number aberration) luminal B HER2-negative (HER2 – human epidermal growth factor receptor type 2) breast cancer during taxane-containing neoadjuvant chemotherapy (NCT) for identification of the groups of potential CNA markers of objective response to treatment and CNA markers of prognosis of hematogenous metastases.

Materials and methods. The study included 28 patients with luminal B HER2-negative breast cancer T1–4N0–3M0 stage IIA–IIIB aged 24–67 years (mean age 44.6 ± 0.3 years). In neoadjuvant regimen, the patients received 4–8 courses of chemotherapy per the ACT, AT schemes and taxotere as monotherapy. As study samples, paired tumor biopsies taken prior to treatment under ultrasound control and operative material after neoadjuvant therapy were used. Micromatrix analysis was performed using high density DNA CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). The results were processed using Chromosome Analysis Suite 4.0 (Affymetrix, USA) software. Statistical data processing was performed in Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA) software.

Results. Objective response was observed in the absence of amplification in the 20q11.22 ($p = 0.003$) region and presence of amplifications in the 16p13.2 ($p = 0.027$) locus in the tumor prior to treatment. After NCT, hematogenous metastases developed in the tumor in the presence of a small number of amplifications in the 20q13.33 ($p = 0.002$) locus.

Conclusion. Potential predictive CNA markers of objective response to treatment and prognostic CNA markers of hematogenous metastases during administration of taxane-containing schemes of neoadjuvant chemotherapy were identified.

Keywords: breast cancer, tumor CNA landscape, taxane-containing scheme, neoadjuvant chemotherapy, copy number aberration, outcome prediction

For citation: Ibragimova M.K., Kravtsova E.A., Tsyganov M.M., Litviakov N.V. CNA landscape of HER2-negative breast cancer during administration of taxane-containing schemes of neoadjuvant chemotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):53–60. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-53-60>

ВВЕДЕНИЕ

Таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел, наряду с препаратами антрациклинового ряда играют ключевую роль в протоколах химиотерапии (ХТ) как на ранней стадии, так и на поздних стадиях и при метастатических поражениях и являются основой неoadъювантной ХТ (НХТ) для пациентов с раком молочной железы (РМЖ) [1].

Несмотря на то что применение таксанов демонстрирует значительную эффективность при лечении РМЖ, важно понимать наличие ограничивающих побочных эффектов, таких как миелосупрессия, гематологическая и желудочно-кишечная токсичность, периферическая сенсорная нейропатия, анафилактические реакции и развитие лекарственной устойчивости. Более того, наличие нейротоксичности является причиной, ограничивающей дозу терапии РМЖ данными противоопухолевыми агентами [2].

В мировой литературе вопрос о применении таксанов в предоперационном лечении РМЖ рассмотрен

довольно широко: изучены показатели полного патоморфологического ответа при использовании данных препаратов [3] с учетом молекулярного подтипа опухоли [4], описаны механизмы резистентности [5] и терапевтические стратегии борьбы с ней [6], проанализированы побочные эффекты и способы их преодоления [2], описаны клинические перспективы использования этих лекарственных средств [7], которые внесены в клинические рекомендации по лечению РМЖ [8].

Согласно рекомендациям по назначению НХТ эндокринной и таргетной терапии при РМЖ Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO) пациенткам с HER2-положительным (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) и трижды негативным РМЖ следует назначать схему лечения, содержащую антрациклины и таксаны, в неoadъювантном режиме (тип рекомендаций: основаны на фактических данных; польза больше, чем вред; качество доказательств: высокое; сила рекомендации: сильная) [9].

Необходимость в НХТ, как и в адъювантной ХТ, при ER-положительном (ER — рецептор эстрогена) и HER2-отрицательном РМЖ зависит от риска метастазирования и рецидива. При назначении адъювантного лечения необходимо учитывать результаты мультигенного анализа, позволяющего выявить пациентов с высоким риском возникновения названных процессов, которые могут получить преимущество в выживаемости за счет ХТ [10]. Также проведен анализ экспрессии генов Oncotype DX в условиях НХТ. В проспективном нерандомизированном исследовании 97 пациенток с HER2-негативным РМЖ получили НХТ на основе таксана. До начала лечения для прогнозирования ответа на НХТ определена экспрессия генов в биопсийных образцах опухоли. Значимая связь ($p < 0,05$) между экспрессией генов и частотой полного патоморфологического ответа (pCR) наблюдалась для 14 генов, включая *CYBA*. При этом pCR выявлен при более низкой экспрессии группы генов *ER* и более высокой экспрессии группы генов пролиферации. Следует отметить, что pCR была более вероятной при высоком риске развития рецидива ($p = 0,008$) [11]. Однако результаты другого исследования, в котором 60 пациенток с ER-положительным/HER2-негативным РМЖ получали НХТ на основе таксана, не показали статистически значимой связи между ответом опухоли на лечение и размером опухоли/возрастом больных/статусом лимфатических узлов ($p > 0,05$). Статистически значимой связи ответа опухоли на лечение с риском возникновения рецидива как категориальной или непрерывной переменной не выявлено ($p = 0,21$ и $p = 0,7$ соответственно). Однако более низкая экспрессия *ER* коррелировала с ответом на лечение ($p = 0,03$) [12]. Более того, при изучении порядка последовательности назначения антрациклинов и таксанов (в режиме НХТ) на частоту pCR у пациенток с HER2-негативным РМЖ не выявлено значимого влияния на клинические результаты терапии [13].

Согласно существующим практическим рекомендациям по лекарственному лечению РМЖ таксаны являются важным противоопухолевым препаратом, который используют в ХТ 1-й линии при всех молекулярных подтипах РМЖ и метастатическом РМЖ [14]. Это подчеркивает важность идентификации прогностических биомаркеров ответа на назначаемое лечение и предиктивных маркеров риска метастазирования для персонализации назначения НХТ и улучшения терапевтических результатов.

В настоящем исследовании изучено изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа под действием таксаносодержащих схем НХТ с целью выявления предиктивных CNA-маркеров объективного ответа на лечение и потенциальных CNA-маркеров прогнозирования возникновения гематогенного метастазирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 28 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ T1–4N0–3M0 (IIA–IIIB стадии) люминального В HER2-негативного подтипа в возрасте 24–67 лет (средний возраст $44,6 \pm 0,3$ года). Люминальный В HER2-негативный подтип РМЖ характеризуется наличием на поверхности клеток рецепторов к эстрогену (ER+) и высоким уровнем Ki-67 ($> 30\%$), при этом рецепторы прогестерона (PR) могут отсутствовать (PR+ или PR–).

В неоадъювантном режиме пациентки получали 4–8 курсов ХТ по схемам АСТ (доксорубицин + циклофосфан + паклитаксел), АТ (доксорубицин + паклитаксел) и таксотер в монорежиме. Эффективность предоперационной ХТ оценивали по критериям Всемирной организации здравоохранения и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) с помощью ультразвукового исследования (УЗИ) и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НХТ и перед операцией. Регистрировались полная регрессия (100 % уменьшение объема опухоли), частичная регрессия (уменьшение объема опухоли более чем на 50 %), стабилизация (снижение объема опухоли менее чем на 50 % или увеличение не более чем на 25 %) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25 %) заболевания. Все случаи полной регрессии подтверждены морфологически. Согласно международным рекомендациям при проведении предоперационной ХТ больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на НХТ, а больные с частичной и полной регрессией — группу объективного ответа. В табл. 1 представлена клинкоморфологическая характеристика пациенток, включенных в исследование.

В качестве исследуемого материала использованы парные биопсийные опухолевые образцы, взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал после НХТ для каждой пациентки.

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования выполняли с помощью системы Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, США). Для обработки результатов использовали программу Chromosome Analysis Suite 4.0 (Affymetrix, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки различий в частотах использовали χ^2 -критерий (<http://vassarstats.net/index.html>). Анализ выживаемости проводили с помощью метода Каплана–Майера и *log-rank*-теста.

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных раком молочной железы, включенных в исследование

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with breast cancer included in the study

Показатель Parameter	Число больных, n (%) Number of patients, n (%)
Возраст, лет: Age, years:	
≤45	17 (60,7)
>45	11 (39,3)
Менструальный статус: Menstrual status:	
сохранен preserved	17 (60,8)
пременопауза perimenopause	7 (25,0)
менопауза menopause	2 (7,1)
постменопауза postmenopause	2 (7,1)
Гистологический тип опухоли: Histological type of the tumor:	
инвазивный протоковый рак invasive ductal carcinoma	12 (42,9)
инвазивный дольковый рак invasive lobular carcinoma	5 (17,9)
инвазивная карцинома неспецифического типа invasive carcinoma unspecified	9 (32,1)
другие типы other types	2 (7,1)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1	3 (10,8)
T2	21 (75,0)
T3	2 (7,1)
T4	2 (7,1)
Лимфогенное метастазирование: Lymphogenic metastases:	
N0	10 (35,8)
N1	14 (50,0)
N2	2 (7,1)
N3	2 (7,1)
Ответ на неoadъювантную химиотерапию: Response to neoadjuvant chemotherapy:	
прогрессирование progression	0
стабилизация stabilization	6 (21,4)
частичная регрессия partial regression	22 (78,6)
Медиана наблюдения за пациентками, мес, M ± SE (min–max) Median follow-up period, months, M ± SE (min–max)	56,3 ± 1,2 (9–122)
Частота метастазирования Metastasis rate	7 (25,0)
Медиана возникновения гематогенного метастазирования, мес (M ± SE) Median time of hematogenous metastasis, months (M ± SE)	32,7 ± 0,3 (11–89)

Примечание. M – среднее значение; SE – ошибка среднего.
Note. M – mean; SE – standard error of mean.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На 1-м этапе исследования для оценки изменения CNA-ландшафта опухоли под действием таксансодержащих схем НХТ проведено описание CNA-ландшафта опухоли до и после лечения и оценены изменения в частоте CNA в опухоли.

Наибольшее количество амплификаций в опухоли (82,1 % пациенток) до лечения обнаружено в локусах 1q31.2 и 1q32.1. Также выявлено, что на протяженном участке длинного плеча 8-й хромосомы при полном отсутствии делетированных регионов у 60,7 % больных присутствуют амплификации в локусах 8q21.12, 8q23.1-3, 8q24.13, 8q24.21 и 8q24.3.

Наибольшая частота делеций (85,7 % больных) обнаружена в локусе 16q21 (при полном отсутствии амплификаций). Также выявлено, что на протяженном участке длинного плеча 16-й хромосомы при полном отсутствии амплифицированных регионов у 82,9 % больных наблюдается делеция в локусах 16q22.1, 16q23.2, 16q23.3 и 16q24.1.

Наибольшее количество амплификаций в опухоли (46,4 % пациенток) после лечения обнаружено в локусах 1q31.3 и 1q32.1 при полном отсутствии делеций в данных регионах. Наибольшая частота делеций в опухоли (39,3% пациенток) после лечения выявлена в локусе 16q12.2.

В ходе оценки изменений частоты CNA в опухоли в результате применения таксансодержащих схем НХТ обнаружено статистически значимое снижение частоты амплификаций в локусах 8q11.23, 8q12.1 и 8q13.2 с 50,0 до 14,3 % (до лечения – в 14 из 28 случаев, после НХТ – в 4 из 28 случаев) ($p = 0,00514$) и статистически значимое снижение частоты делеций в локусе 6q21 – с 57,1 до 7,1 % (до лечения – в 16 из 28 случаев, после НХТ – в 2 из 28 случаев) ($p = 0,00006$).

На рис. 1 представлена частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме у пациенток с РМЖ до и после применения таксансодержащих схем НХТ.

Для выявления потенциальных предиктивных CNA-маркеров объективного ответа на НХТ при применении таксансодержащих схем проанализировано распределение частот CNA в опухоли до лечения в зависимости от ответа на предоперационную ХТ.

В исследуемой группе после НХТ у 22 больных зарегистрирована частичная регрессия опухоли (группа 1), у 6 – стабилизация опухолевого процесса (группа 2) (табл. 1).

У пациенток группы 1 наибольшее количество амплификаций (86,4 %) обнаружено в локусах 1q31.2, 1q32.1, делеций (90,9 %) – в локусе 16q21 при отсутствии амплификаций. У больных группы 2 наибольшая частота амплификаций (83,03 %) выявлена в локусах 1q23.3, 1q24.1-24.3, 1q25.1-25.3 при отсутствии делеций, делеций (83,3 %) – в локусах 6q14.1-14.3, 6q15, 6q16.1-16.3, 6q21 17p13.3-13.1 и 17p12 при отсутствии амплификаций.

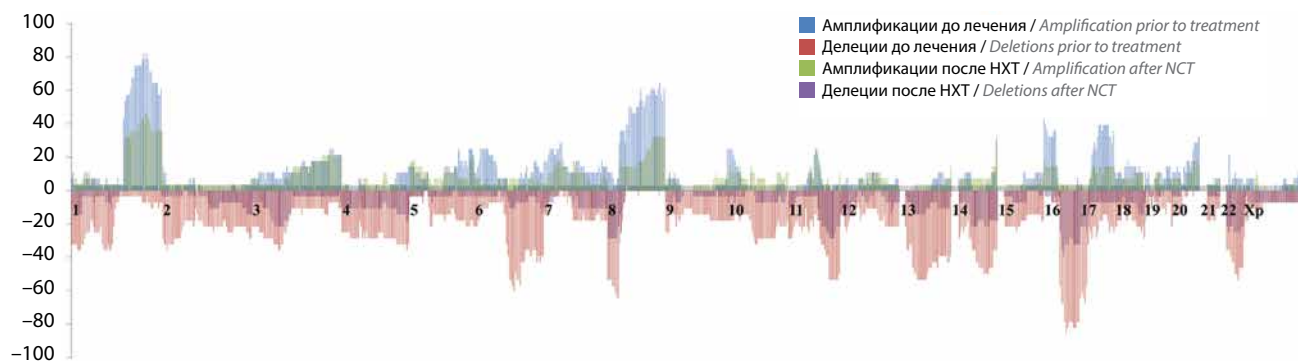


Рис. 1. Частота амплификаций и делеций в каждой хромосоме у пациенток, которым назначали таксансодержащие схемы неoadъювантной химиотерапии (НХТ), до и после лечения

Fig. 1. Frequency of amplifications and deletions in every chromosome in patients with breast cancer who were prescribed taxane-containing schemes of neoadjuvant chemotherapy (NCT), before and after treatment

Результаты сравнения частоты встречаемости CNA показали, что в группе 1 наблюдался объективный ответ на НХТ при отсутствии амплификаций в локусе 20q11.22 (0/22 (0 %) событий) по сравнению с группой 2 (3/6 (50,0 %) событий) ($p = 0,003$).

Также показано, что в группе 1 наблюдался объективный ответ на НХТ при наличии амплификаций в регионе 16p13.2 (11/22 (50,0 %) событий) по сравнению с группой 2 (0/6 (0 %) событий) ($p = 0,027$).

Потенциально данные локусы могут выступать в качестве предиктивных маркеров объективного ответа на НХТ при применении в режиме предоперационной химиотерапии таксансодержащих схем лечения.

Для выявления потенциальных прогностических CNA-маркеров возникновения гематогенного метастазирования при применении таксансодержащих схем НХТ проведен анализ распределения частот CNA

в опухоли в зависимости от статуса гематогенного метастазирования.

В исследуемой группе у 7 пациенток зарегистрировано развитие гематогенных метастазов. Выделены 4 подгруппы: подгруппа 1 — без гематогенного метастазирования до лечения, подгруппа 2 — без гематогенного метастазирования после НХТ, подгруппа 3 — с наличием гематогенного метастазирования до лечения, подгруппа 4 — с наличием гематогенного метастазирования после НХТ.

У пациенток подгруппы 1 наибольшее количество амплификаций (80,9 %) обнаружено в локусах 1q31.2, 1q31.3 и 1q32.1, делеций (85,7 %) — в локусе 16q21 при отсутствии амплификаций. У больных подгруппы 3 наибольшая частота амплификаций (85,7 %) детектирована в локусах 1q31.1, 1q31.2, 1q32.1, 1q32.2, делеций (85,7 %) — в локусах 16q13, 16q21, 16q22.1-23.3,

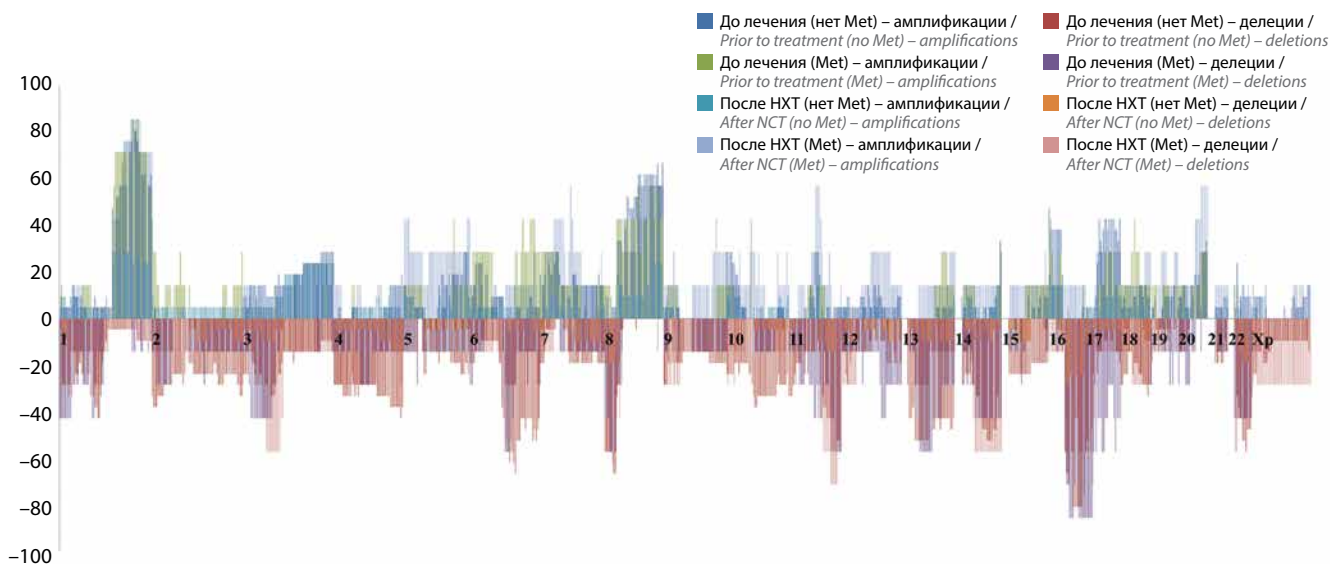


Рис. 2. Частота встречаемости CNA у больных раком молочной железы, которым назначали таксансодержащие схемы неoadъювантной химиотерапии (НХТ), до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования. Met — гематогенное метастазирование

Fig. 2. Frequency of CNA in patients with breast cancer who were prescribed taxane-containing schemes of neoadjuvant chemotherapy (NCT), before and after treatment depending on the presence of hematogenous metastases. Met — hematogenous metastases

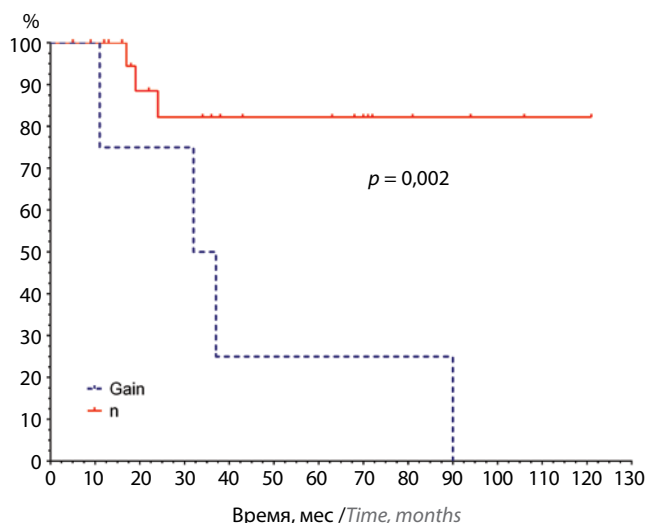


Рис. 3. Показатели безметастатической выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от наличия в опухоли амплификаций в локусе 20q13.33. Gain — амплификация; n — норма

Fig. 3. Metastasis-free survival in patients with breast cancer depending on the presence in the tumor of amplifications in 20q13.33 locus. Gain — amplification; n — normal

16q24.1, 16q24.3, 17p13.3-13.1, 17p12, 17p11.2 при отсутствии амплификаций.

У пациенток подгруппы 2 наибольшее количество амплификаций (33,3 %) обнаружено в локусах 1q31.3 и 1q32.1 при отсутствии делеций, а делеций (28,6 %) — в локусах 16q12.1 и 16q12.2. У больных подгруппы 4 наибольшая частота амплификаций (85,7 %) детектирована в локусах 1q25.3, 1q31.1-31.3, 1q32.1-32.3, делеций (71,4 %) — в локусах 11q23.1-23.3, 11q24.1, 17p11.2 при отсутствии амплификаций.

Согласно результатам сравнения частоты встречаемости CNA в группах пациенток после лечения в зависимости от статуса гематогенного метастазирования, его возникновение наблюдалось при большем количестве амплификаций в локусе 20q13.33 (0/21 (0 %) событий при отсутствии гематогенного метастазирования и 4/7 (57,1 %) событий при его наличии) ($p = 0,00171$). Потенциально данный локус может выступать в качестве прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования у больных РМЖ при назначении таксансодержащих схем НХТ.

На рис. 2 представлена частота встречаемости CNA у больных РМЖ, которым назначены таксансодержащие схемы НХТ, до и после лечения в зависимости от наличия гематогенного метастазирования.

Для оценки показателей безметастатической выживаемости в зависимости от выявленных потенциальных прогностических CNA-маркеров возникновения гематогенного метастазирования при применении таксансодержащих схем НХТ построены кривые выживаемости по методу Каплана—Майера. На рис. 3 представлена безметастатическая выживаемость пациенток, включенных в исследование, в зависимости от наличия в опухоли амплификаций в локусе 20q13.33 ($p = 0,002$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения исследования выявлены потенциальные предиктивные CNA-маркеры объективного ответа на НХТ и маркеры риска развития гематогенного метастазирования при применении таксансодержащих схем лечения у пациенток с люминальным В HER2-негативным РМЖ.

В частности, в качестве потенциальных предиктивных маркеров объективного ответа можно рассматривать полное отсутствие амплификаций в 20q11.22 ($p = 0,003$) и наличие амплификаций в 16p13.2 локусах ($p = 0,027$), а в качестве потенциального прогностического маркера возникновения гематогенного метастазирования — наличие амплификаций в регионе 20q13.33 ($p = 0,0017$).

Мы проанализировали данные мировой литературы, посвященные анализу связи выявленных локусов с возникновением, прогрессированием заболевания и исходом лечения при РМЖ.

В масштабной работе G. Jia и соавт. с участием 386 тыс. женщин азиатского и европейского происхождения проанализирован риск возникновения РМЖ на уровне генома и транскриптома. Обнаружены 11 генов, связанных с общим риском возникновения РМЖ (*NBPF8*, *PFNIP2*, *RNF123*, *NSUN2*, *EEF1AKMT2*, *SRP14-DT*, *STRCP1*, *MAP2K4*, *ZNF793-AS1*, *CPNE1*, *RGS19*). При этом показано, что *CPNE1* расположен в локусе 20q11.22, идентифицированном в метаанализах перекрестного происхождения [15]. Ранее сообщалось, что *CPNE1* сверхэкспрессируется при трижды негативном РМЖ и способствует развитию опухолей и радиорезистентности посредством сигнального пути АКТ [16].

В работе по изучению генов, коэкспрессирующих с *PALB2* при РМЖ и раке поджелудочной железы с использованием данных проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и «Атласа белков человека», показано, что экспрессия 6 генов (*EARS2*, *ARL6IP1*, *DNAJA3*, *KNOP1*, *RPUSD1* и *TMEM186* (16p13.2)) значительно коррелирует с экспрессией *PALB2* как при РМЖ, так и при раке поджелудочной железы.

В исследовании G. Sheng и соавт. с помощью данных проекта Pan-cancer analysis изучена роль гена *PSMA7* как мишени для амплификации в 20q13.33 при опухолеобразовании [17].

Длинное плечо 20-й хромосомы (20q) является одной из геномных горячих точек, где изменения числа копий часто происходят в различных типах опухолей. В данной работе с использованием данных TCGA и GEO обнаружена частая амплификация числа копий в 20q. Поддиапазон хромосомы 20q13.33 амплифицирован при нескольких видах рака, включая РМЖ. Среди генов в 20q13.33 обнаружен ген *PSMA7*, который участвует в различных процессах опухолевой клетки, включая контроль транскрипции, иммунологические и стрессовые реакции, регуляцию клеточного цикла,

дифференциацию, пролиферацию и апоптоз [18]. Выявлена корреляция экспрессии данного гена с показателями общей и безметастатической выживаемости при РМЖ: отношение рисков (ОР) 1,48 (доверительный интервал (ДИ) 1,21–1,8; $p = 0,00011$ и ОР 1,54; ДИ 1,32–1,8; $p = 3e^{-8}$ соответственно [17]. Ранее также было показано прогностическое значение экспрессии гена *PSMA7* у пациенток с РМЖ ($n = 75$): высокий уровень его экспрессии связан с более низкими показателями общей выживаемости (ОР 1,39; ДИ 1,12–1,72; $p = 0,0024$) [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для пациенток с люминальным В HER2-негативным РМЖ выявлены потенциальные предиктивные CNA-маркеры объективного ответа (амплификации в локусах 20q11.22 и 16p13.2) и прогностический CNA-маркер возникновения гематогенного метастазирования (амплификации в локусе 20q13.33). Результаты исследования имеют частичное подтверждение в мировой литературе, однако в дальнейшем необходимо проведение валидации для обоснования применения полученных маркеров.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rašić A., Sofić A., Bešlija S. et al. Effects of adding taxane to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Med Glas (Zenica)* 2019;16(1):1–6. DOI: 10.17392/964-19
2. Lai J.-I., Chao T.-C., Liu C.-Y. et al. A systemic review of taxanes and their side effects in metastatic breast cancer. *Front Oncol* 2022;12:940239. DOI: 10.3389/fonc.2022.940239
3. Earl H.M., Vallier A.L., Hiller L. et al. Effects of the addition of gemcitabine, and paclitaxel-first sequencing, in neoadjuvant sequential epirubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel for women with high-risk early breast cancer (Neo-tAnGo): an open-label, 2x2 factorial randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(2):201–12. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70554-0
4. Orsaria P., Grasso A., Ippolito E. et al. Clinical outcomes among major breast cancer subtypes after neoadjuvant chemotherapy: impact on breast cancer recurrence and survival. *Anticancer Res* 2021;41(5):2697–709. DOI: 10.21873/anticancer.15051
5. Maloney S.M., Hoover C.A., Morejon-Lasso L.V. et al. Mechanisms of taxane resistance. *Cancers* 2020;12(11):3323. DOI: 10.3390/cancers12113323
6. Das T., Anand U., Pandey S.K. et al. Therapeutic strategies to overcome taxane resistance in cancer. *Drug Resistance Updates* 2021;55:100754. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100754
7. Jivani A., Shinde R.K. A comprehensive review of taxane treatment in breast cancer: clinical perspectives and toxicity profiles. *Cureus* 2024;16(4):e59266. DOI: 10.7759/cureus.59266
8. Cardoso F., Senkus E., Costa A. et al. 4th ESO–ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 4). *Ann Oncol* 2018;29(8):1634–57. DOI: 10.1093/annonc/mdy192
9. Korde L.A., Somerfield M.R., Carey L.A. et al. Neoadjuvant chemotherapy, endocrine therapy, and targeted therapy for breast cancer: ASCO guideline. *J Clin Oncol* 2021;39(13):1485–505. DOI: 10.1200/JCO.20.03399
10. Sparano J.A., Gray R.J., Makower D.F. et al. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. *N Engl J Med* 2018;379:111–21. DOI: 10.1056/nejmoa1804710
11. Chang J.C., Makris A., Gutierrez M.C. et al. Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients. *Br Cancer Res Treat* 2008;108(2):233–40. DOI: 10.1007/s10549-007-9590-z
12. Soran A., Bhargava R., Johnson R. et al. The impact of Oncotype DX(R) recurrence score of paraffin-embedded core biopsy tissues in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *Breast Dis* 2016;36:65–71. DOI: 10.3233/bd-150199
13. Tesch M.E., Chia S.K., Simmons C.E. et al. Impact of sequence order of anthracyclines and taxanes in neoadjuvant chemotherapy on pathologic complete response rate in HER2-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2021;187(1):167–76. DOI: 10.1007/s10549-021-06110-0
14. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. *Злокачественные опухоли* 2023;13(3s2-1):157–200. DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200
15. Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н. et al. Practical recommendations for drug treatment of breast cancer. *Zlokachestvennyye opuholi = Malignant Tumors* 2023;13(3s2-1):157–200. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200
16. Jia G., Ping J., Shu X. et al. Genome- and transcriptome-wide association studies of 386,000 Asian and European-ancestry women provide new insights into breast cancer genetics. *AJHG* 2022;109(12):2185–95. DOI: 10.1016/j.ajhg.2022.10.011
17. Shao Z., Ma X., Zhang Y. et al. CPNE1 predicts poor prognosis and promotes tumorigenesis and radioresistance via the AKT signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Mol Carcinog* 2020;59(5):533–44. DOI: 10.1002/mc.23177
18. Sheng G., Li F., Jin W., Wang K. Pan-cancer analysis identifies PSMA7 as a targets for amplification at 20q13.33 in tumorigenesis. *Sci Rep* 2024;14:3034. DOI: 10.1038/s41598-024-53585-0
19. Padmanabhan A., Vuong S.A., Hochstrasser M. Assembly of an evolutionarily conserved alternative proteasome isoform in human cells. *Cell Rep* 2016;14(12):2962–74. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.02.068
20. Xiao Y., Zhang S.J., Yan X. et al. MiR-466 as a poor prognostic predictor suppresses cell proliferation and EMT in breast cancer cells by targeting PSMA7. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2022;26(11):3799. DOI: 10.26355/eurrev_202206_28946

Вклад авторов

М.К. Ибрагимова: разработка концепции исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

Е.А. Кравцова, М.М. Цыганов: сбор данных, написание текста статьи;

Н.В. Литвяков: сбор данных, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

Authors' contributions

M.K. Ibragimova: development of the research concept, collection, analysis and interpretation of data, review of publications on the topic of the article, article writing;

E.A. Kravtsova, M.M. Tsyganov: data collection, article writing;

N.V. Litviakov: data collection, editing, and approval of the final version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Е.А. Кравцова / E.A. Kravtsova: <https://orcid.org/0000-0002-9022-7764>

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00499).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-25-00499).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 1 от 14.01.2013).

Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

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

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

Статья поступила: 30.09.2024. **Принята к публикации:** 17.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 30.09.2024. **Accepted for publication:** 17.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-61-66>

Исследование противоопухолевой эффективности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас) на ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого

Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, А.В. Иванов, А.М. Шишкин, В.В. Каминский, О.Б. Князева, И.А. Пучков, В.К. Боженко

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

Контакты: Татьяна Михайловна Кулинич sobral@mail.ru

Актуальной проблемой терапии онкологических заболеваний в последние годы является лечение опухолей, в патогенезе которых участвует онкоген *RAS*. Высокая доля мутаций в этом гене характерна для опухолей различных локализаций, что делает его привлекательной мишенью. Современные препараты, селективно ингибирующие мутантный *KRAS*, имеют значительные преимущества по сравнению с традиционными методами лечения, но обладают и недостатками, среди которых высокая частота развития побочных эффектов. Поэтому разработка новых препаратов – ингибиторов Ras-ГТФаз, имеющих улучшенные фармакодинамические характеристики, является важной задачей. Цель работы – исследование *in vivo* специфической фармакологической активности нового пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас), на ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого человека.

Получены статистически значимые данные об увеличении продолжительности жизни мышей, которым вводили ингибитор Ras-ГТФазы, по сравнению с контрольной группой: на 16 % при дозе 5 мг/кг и на 36,3 % при дозе 10 мг/кг. Также наблюдалось дозозависимое торможение роста опухоли на 30,5 и 57,3 % соответственно. Высокая специфичность, обусловленная механизмом действия пептидной конструкции, позволяет ожидать минимизацию побочных эффектов потенциального лекарственного средства Инг-Рас.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, Инг-Рас, *RAS*, ингибитор Ras-ГТФазы, таргетная терапия

Для цитирования: Кулинич Т.М., Кудинова Е.А., Иванов А.В. и др. Исследование противоопухолевой эффективности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас) на ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):61–6.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-61-66>

Study of antitumor effectiveness of Ras GTPase peptide inhibitor (Inh-Ras) in xenograft model of non-small cell lung cancer

T.M. Kulinich, E.A. Kudinova, A.V. Ivanov, A.M. Shishkin, V.V. Kaminsky, O.B. Knyazeva, I.A. Puchkov, V.K. Bozhenko

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

Contacts: Tatiana Mikhailovna Kulinich sobral@mail.ru

In recent years, treatment of tumors associated with the *RAS* oncogene has become an important problem. High level of mutations in this gene is characteristic of tumors of various locations which makes it an attractive target. Modern drugs selectively inhibiting mutant *KRAS* have significant benefits compared to traditional treatment methods but also have shortcomings including high rate of adverse events. Therefore, development of new drugs – Ras GTPase inhibitors – with better pharmacodynamics characteristics is an important task.

Aim. To study *in vivo* specific pharmacological activity of a new peptide inhibitor of Ras GTPase (Inh-Ras) in a xenograft model of human non-small cell lung cancer.

Statistically significant data on increased lifespan of mice who were administered Ras GTPase inhibitor compared to the control group were obtained: by 16 % for dose 5 mg/kg and by 36.3 % for dose 10 mg/kg. Additionally, dose-dependent slowing of tumor growth by 30.5 and 57.3 %, respectively, was observed. High specificity due to the mechanism of action of the peptide construct allows to anticipate minimization of side effects of the potential drug Inh-Ras.

Keywords: non-small cell lung cancer, Ing-Ras, *RAS*, Ras-GTPase inhibitor, targeted therapy

For citation: Kulinich T.M., Kudinova E.A., Ivanov A.V. et al. Study of antitumor effectiveness of Ras GTPase peptide inhibitor (Inh-Ras) in xenograft model of non-small cell lung cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):61–6. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-61-66>

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то что гены семейства *RAS* являются одними из самых распространенных онкогенов человека, долгое время эта терапевтическая мишень была недоступна для фармакологических препаратов. Только в 2021 г. (в РФ в 2023 г.) появились первые разрешенные к клиническому применению селективные ингибиторы Ras-ГТФазы. Однако даже их использование не уменьшает важность проблемы поиска новых фармацевтически активных молекул, направленных на данную мишень, что связано с большим количеством побочных эффектов, характерных для низкомолекулярных ингибиторов.

Результаты анализа 4 крупнейших баз данных, содержащих молекулярно охарактеризованные образцы опухолей, показали, что приблизительно 19 % опухолей различных локализаций (примерно 3,4 млн новых случаев в год во всем мире) имеют мутации в гене *RAS*, при этом мутации в гене *KRAS* ответственны за формирование 75 % новообразований [1]. Высокая частота мутаций в гене *RAS* наблюдается при аденокарциномах различных отделов кишечника, раке легкого (РЛ), щитовидной железы, эндометрия, мочевого пузыря, холангиокарциномы, меланомы кожи и других форм рака [2]. При раке поджелудочной железы *RAS*-мутации встречаются более чем в 90 % случаев [3]. РЛ является наиболее часто диагностируемым онкологическим заболеванием: в 2022 г. зарегистрировано почти 2,5 млн новых случаев, и при этом данное заболевание является основной причиной смертности от рака и приводит к 1,8 млн смертей в год [4]. При аденокарциноме легкого мутация в гене *KRAS* наблюдается более чем в 30 % случаев [1].

Традиционные способы лечения немелкоклеточного РЛ не дают значительного увеличения показателей безрецидивной и общей выживаемости, что обусловило потребность в поиске новых терапевтических подходов [5, 6]. Большинство исследований в области разработки новых средств, ингибирующих Ras-ГТФазу, направлены на поиск низкомолекулярных соединений, в связи с облегченным внутриклеточным транспортом малых молекул. Разрешенные к клиническому применению препараты (соторасиб и адаграсиб) представляют собой низкомолекулярные соединения, направленные на мутантный *KRAS* (*mKRAS*), и нарушают его взаимодействие с гуанозинтрифосфатом, что обеспечивает терапевтический эффект, но приводит к развитию большого количества побочных эффектов.

Одной из ключевых проблем разработки новых лекарственных препаратов является поиск эффективных методов их доставки. Предлагаемый нами подход к созданию новых противоопухолевых препаратов основан на использовании технологии внутриклеточной доставки высокомолекулярных соединений на основе интернализуемых пептидов (cell penetrating peptides, CPP). В рамках этой технологии мы исследовали спектр химерных пептидных конструкций, в состав одной полипептидной цепи которых входят транспортная и функциональная последовательности, направленные на ингибирование внутриклеточной мишени. Полученные результаты показали перспективность использования данного подхода для получения антипролиферативных препаратов, имеющих широкий спектр противоопухолевой активности [7]. Используя технологию, предполагающую объединение в одной молекуле CPP и функционального фрагмента, мы получили пептидную конструкцию — потенциальный лекарственный препарат на основе пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас), включающий транспортную последовательность ANTP и ингибирующий взаимодействие белков Ras и Raf [8]. Ранее в исследованиях *in vitro* было показано, что пептидная конструкция Инг-Рас обладает цитостатической и цитотоксической активностями в отношении культур клеток линий аденокарцином легкого человека A549, толстой кишки человека HT29 и рака яичника человека OAW-42 и OVCAR3 [9, 10].

Цель исследования — изучение специфической фармакологической активности *in vivo* потенциального лекарственного средства Инг-Рас на ксенографтной модели немелкоклеточного РЛ (перевивной клеточной линии A549).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В условиях *in vivo* изучено воздействие пептидного ингибитора Ras-ГТФазы (Инг-Рас) на рост подкожных трансплантатов клеток линии A549 (ATCC® CCL-185™) [11] у иммунодефицитных мышей линии BALBc/nude.

Согласно ранее проведенным исследованиям эффективности ингибитора Ras-ГТФазы *in vitro* подобраны следующие его дозы: 5 и 10 мг/кг. Доза препарата готовилась в 0,2 мл раствора 0,9 % NaCl [9].

Схема введения препарата: 1 раз в 2 дня (через день), начиная с 6-го дня после перевивки опухоли и появления пальпируемого опухолевого узла. Животным контрольной группы внутривенно вводили 0,2 мл

раствора 0,9 % NaCl. Количество введений — 8 (до гибели всех животных контрольной группы на 24-й день эксперимента). Всего в эксперименте участвовали 36 животных.

Стадии эксперимента

Стадия 1 — создание ксенографтной модели. Культивирование и манипуляции с клеточной линией проводили в стерильных условиях. Клетки линии A549 культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в среде DMEM («ПанЭко», Россия), к которой добавляли фетальную бычью сыворотку до 10 % (HyClone, США), стрептомицин (до 100 мкг/мл), пенициллин G (до 100 Ед/мл) и панетицин (G420) (1 мг/мл). Количество жизнеспособных клеток определяли путем подсчета в камере Горяева после окрашивания раствором трипанового синего. Для трансплантации клетки разводили в стерильном растворе Хенкса до концентрации 5×10^6 клеток/мл.

Для получения стандартного прививочного материала штамм клеток A549, выращенный в условиях *in vitro*, вводили подкожно одной мыши линии BALBc/nude. После получения пальпируемого опухолевого образования узел извлекали, гомогенизировали (10 мл фосфатно-солевого буфера («ПанЭко», Россия) с центрифугированием 5 мин при 300g), и клеточный материал повторно вводили другому животному. После повторной перевивки и получения гомогената опухолевых клеток считалось, что получен стандартный прививочный материал, который вводили подкожно животным контрольной и экспериментальных групп в день исследования (0-й день). Рост опухоли определяли по появлению пальпируемого узла.

Стадия 2 — исследование динамики роста опухоли.

Динамику роста опухоли определяли путем оценки размеров пальпируемой подкожной опухоли. Измеряли больший размер опухоли (длину) и перпендикулярный ему меньший размер (ширину). Объем опухоли (V) рассчитывали в мм³ по общепринятой формуле:

$$V = L \times W^2/2,$$

где L — длина опухоли, W — ширина опухоли.

Торможение опухолевого роста (ТРО) рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО} = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \times 100 \%,$$

где $V_{\text{контроль}}$ — объем опухоли у мышей контрольной группы, $V_{\text{опыт}}$ — объем опухоли у мышей опытной группы.

При оценке продолжительности жизни мышей последним днем жизни считался предыдущий день перед днем гибели. Процент увеличения продолжительности жизни (УПЖ) животных вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ} = (\text{СПЖ}_{\text{опыт}} - \text{СПЖ}_{\text{контроль}}) / \text{СПЖ}_{\text{контроль}} \times 100 \%,$$

где СПЖ_{опыт} — средняя продолжительность жизни животных в опытной группе, СПЖ_{контроль} — средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе.

Статистический анализ

Описательная статистика представлена медианой и интерквартильным размахом (25-й процентиль; 75-й процентиль). Для сравнения значений количественных переменных между группами применяли тест Краскела—Уоллиса, для попарных межгрупповых сравнений — тест Данна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием среды для статистических вычислений R 4.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании динамики роста опухоли и выживаемости мышей линии BALBc/nude с подкожно трансплантированной опухолью культуры A549 значимых различий между самцами и самками внутри каждой группы выявлено не было, поэтому данные по самцам и самкам объединены.

Результаты анализа выживаемости экспериментальных животных показали, что введение через день двух доз ингибитора Ras-ГТФазы — 5 мг/кг (группа 1) и 10 мг/кг (группа 2) — значительно увеличивает показатели выживаемости. Когда все животные контрольной группы, получавшие только 0,9 % NaCl, погибли, в группе препарата Инг-Рас в дозе 5 мг/кг оставались живы 66 % мышей, в группе препарата Инг-Рас в дозе 10 мг/кг — 69 %.

Дальнейшее наблюдение показало отсутствие гибели животных в группе 2 вплоть до завершения периода наблюдения (29-й день эксперимента). В группе 1 в ходе наблюдения зафиксированы случаи гибели животных в последний день исследования; остались живы 33 % мышей (рис. 1).

Получены значимые различия в увеличении продолжительности жизни мышей между контрольной группой и группами 1 и 2. В группе 1, где доза препарата составляла 5 мг/кг, она увеличилась на 16 % по сравнению с контрольной группой, в группе 2, где доза была 10 мг/кг, — на 36,3 %. Таким образом, при подкожном введении опухоли культуры A549 (РЛ у человека) применение ингибитора Ras-ГТФазы через день способствует увеличению показателей выживаемости.

Изучение влияния ингибитора Ras-ГТФазы на рост подкожно трансплантированной аденокарциномы легкого человека у мышей BALBc/nude при использовании двух доз препарата показало значительное замедление роста опухоли.

Когда все животные в контрольной группе погибли, у мышей, получавших ингибитор Ras-ГТФазы каждые 2 дня в дозе 10 мг/кг, наблюдалось снижение роста

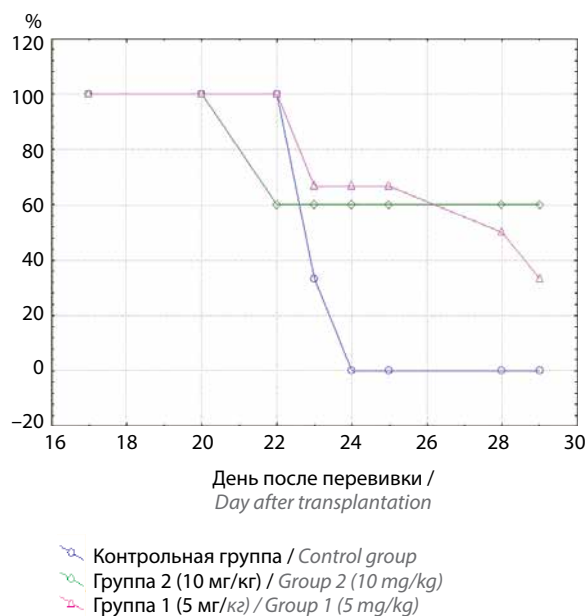


Рис. 1. Выживаемость мышей линии BALBc/nude (самцы + самки), которым подкожно трансплантировали аденокарциному легкого человека (A549) и внутривенно вводили ингибитор Ras-ГТФазы в дозах 0,1 мг/мышь (5 мг/кг) и 0,2 мг/мышь (10 мг/кг)

Fig. 1. Survival of BALBc/nude (males + females) mice who received subcutaneous transplants of human lung adenocarcinoma (A549) and intravenous Ras GTPase inhibitor at doses 0.1 mg/mouse (5 mg/kg) and 0.2 mg/mouse (10 mg/kg)

опухоли на 57,3 %, а у мышей, получавших этот препарат в дозе 5 мг/кг, — на 30,5 % (рис. 2).

Согласно данным, представленным на рис. 2, минимальные различия в объемах опухолей наблюдались с 8-го дня после перевивки опухолей после 1 инъекции ингибитора Ras-ГТФазы. На 22-й день после перевивки (после 8 инъекций лекарственного средства в режиме введения через день) различия между группами были максимальными (рис. 3).

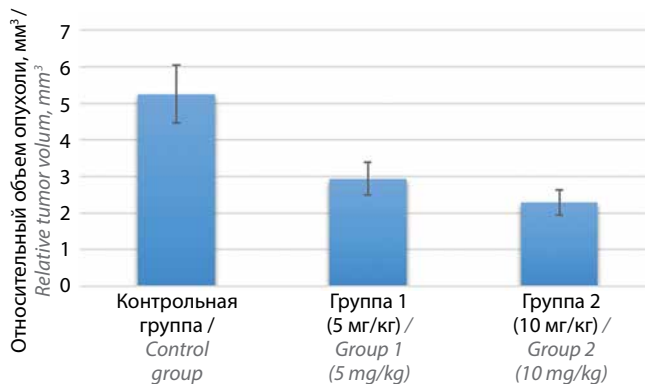


Рис. 3. Изменения относительного объема опухолей у мышей линии BALBc/nude (самцы + самки) при внутривенном введении ингибитора Ras-ГТФазы в дозах 0,1 мг/мышь (5 мг/кг) и 0,2 мг/мышь (10 мг/кг) на 22-й день перевивки опухоли

Fig. 3. Changes in the relative volume of tumors in BALBc/nude mice (males + females) with intravenous administration of a Ras-GTPase inhibitor in doses of 0.1 mg/mouse (5 mg/kg) and 0.2 mg/mouse (10 mg/kg) on the 22nd day of tumor grafting

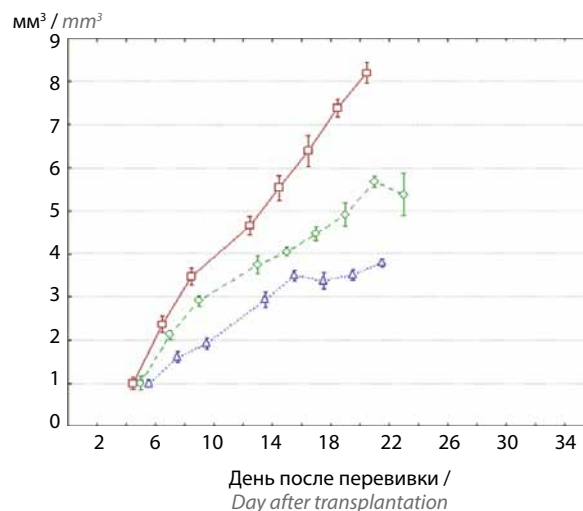


Рис. 2. Изменение объема подкожно трансплантированной аденокарциномы легкого человека (A549) в группах мышей линии BALBc/nude (самцы + самки) при внутривенном введении ингибитора Ras-ГТФазы в дозах 5 и 10 мг/кг. Приведены средние арифметические значения со стандартным отклонением

Fig. 2. Volume variation of subcutaneously transplanted human lung adenocarcinoma tumor (A549) in groups of BALBc/nude mice (males + females) upon intravenous administration of a Ras-GTPase inhibitor in doses of 5 and 10 mg/kg. Arithmetic means with a standard error are given

На рис. 3 представлены изменения относительного объема опухолей (относительно объема опухоли на момент начала введения лекарственного средства) в исследуемых группах на 22-й день после перевивки.

Таким образом, внутривенное введение пептидного ингибитора Ras-ГТФазы в исследуемых группах увеличивает продолжительность жизни мышей и тормозит развитие опухоли. Наибольший эффект наблюдается при использовании препарата в дозе 10 мг/кг: продолжительность жизни животных увеличилась на 36,3 % относительно контрольной группы, торможение роста опухоли на момент гибели всех мышей группы контроля составило 57,3 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка эффективных ингибиторов Ras является важной клинической и научной задачей, однако ее решение с помощью использования низкомолекулярных соединений затруднительно в связи с высоким сродством мутантного гена *Ras* к гуанозинтрифосфату, что приводит к развитию большого количества побочных эффектов при системном применении неселективных/низкомолекулярных ингибиторов.

Результаты исследований нового пептидного ингибитора Ras показали, что разработанная последовательность способна эффективно проявлять цитостатические противоопухолевые свойства. Пептидный ингибитор Ras-ГТФазы тормозит развитие

опухолевого узла аденокарциномы легкого (A549) и увеличивает продолжительность жизни мышей. Многократные внутривенные инъекции исследуемого препарата хорошо переносились животными, исследуемые дозы оказывали статистически значимые противоопухолевые эффекты.

В связи с особенностями структуры пептидного ингибитора Ras-ГТФазы предполагается снижение количества побочных эффектов, описанных, в частности, для одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) селективных

ингибиторов Ras-ГТФазы соторасиба и адаграсиба [12–14]. Нежелательные последствия терапии Инг-Рас будут минимальными за счет высокой специфичности и отсутствия эффектов off-target.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что пептидный ингибитор Ras-ГТФазы обладает противоопухолевым эффектом в отношении клеток немелкоклеточного РЛ человека (A549), что позволяет рассматривать его в качестве перспективного противоопухолевого средства.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Prior I.A., Hood F.E., Hartley J.L. The frequency of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2020;80(14):2969–74. DOI: 10.1158/0008-5472.can-19-3682
2. Simanshu D.K., Nissley D.V., McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell* 2017;170(1):17–33. DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.009
3. Kleeff J., Korc M., Apte M. et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016;16022. DOI: 10.1038/nrdp.2016.22
4. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024;74(3):229–63. DOI: 10.3322/caac.21834
5. Hudson A., Chan C., Woolf D. et al. Is heterogeneity in stage 3 non-small cell lung cancer obscuring the potential benefits of dose-escalated concurrent chemo-radiotherapy in clinical trials? *Lung Cancer* 2018;118:139–47. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.02.006
6. Pöttgen C., Eberhardt W., Stamatis G. et al. Definitive radiochemotherapy versus surgery within multimodality treatment in stage III non-small cell lung cancer (NSCLC) - a cumulative meta-analysis of the randomized evidence. *Oncotarget* 2017;8(25):41670–8. DOI: 10.18632/oncotarget.16471
7. Кулинич Т.М., Иванов А.В., Захаренко М.В. и др. Интернализуемые пептиды (cell-penetrating peptides, CPPs) и возможности их терапевтического применения. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии* 2020;20(4):106–26. Kulinich T.M., Ivanov A.V., Zakharenko M.V. et al. Internalized peptides (cell-penetrating peptides, Cps) and the possibilities of their therapeutic use. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Radiology* 2020;20(4):106–26. (In Russ.).
8. Боженко В.К., Гончаров С.В., Кудинова Е.А. и др. Оценка безопасности с установлением максимально переносимой дозы ингибитора RAS-ГТФазы (Инг-Рас) для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта: предварительные результаты исследования I. *Альманах клинической медицины* 2023;51(7):376–96. DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-045 Bozhenko V.K., Goncharov S.V., Kudinova E.A. et al. Safety assessment with the establishment of the maximum tolerated dose of RAS-GTPase inhibitor (Ing-Ras) for the treatment of tumors of the gastrointestinal tract: preliminary results of study I. *Al'manah klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine* 2023;51(7):376–96. (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-045
9. Кулинич Т.М., Иванов А.В., Большакова О.Б. и др. Изучение специфической фармакологической активности последовательности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы в условиях *in vitro*. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии* 2022;22(4):347–60. Kulinich T.M., Ivanov A.V., Bolshakova O.B. et al. To study the specific pharmacological activity of the Ras-GTPase peptide inhibitor sequence *in vitro*. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Radiology* 2022;22(4):347–60. (In Russ.).
10. Кулинич Т.М., Шишкин А.М., Иванов А.В. и др. Изучение противоопухолевых свойств пептидной конструкции, включающей интернализуемую последовательность и ингибитор Ras-ГТФазы, в отношении клеток линий рака толстой кишки (HT29) и рака яичника (OAW-42, OVCAR-3). *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии* 2021;21(4):100–20. Kulinich T.M., Shishkin A.M., Ivanov A.V. et al. To study the antitumor properties of a peptide construct, including an internalized sequence and a Ras-GTPase inhibitor, in relation to colon cancer (HT29) and ovarian cancer (OAW-42, OVCAR-3) cell lines. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of Radiology* 2021;21(4):100–20. (In Russ.).
11. American Type Culture Collection (ATCC): cell products/human cells/CRM-CCL-185. Available at: <https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185/>.
12. Лактионов К.К., Саранцева К.А., Нелюбина Л.А. и др. KRAS-мутированный немелкоклеточный рак легкого: новые стратегии терапии. *Сибирский онкологический журнал* 2024;23(2):72–81. DOI: 10.21294/1814-4861-2024-23-2-72-81 Laktionov K.K., Sarantseva K.A., Nelyubina L.A. et al. KRAS-mutated non-small cell lung cancer: new treatment strategies. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2024;23(2):72–81. DOI: 10.21294/1814-4861-2024-23-2-72-81
13. Amgen Inc. LUMAKRAS™ (sotorasib) tablets, for oral use: US prescribing information. 2021. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/214665s000lbl.pdf.
14. Jänne P.A., Riely G.J., Gadgeel S.M. et al. Adagrasib in non-small-cell lung cancer harboring a KRAS G12C mutation. *New Engl J Med* 2022;387(2):120–31. DOI: 10.1056/nejmoa2204619

Благодарность. Авторы выражают благодарность д.м.н., академику Российской академии наук, профессору, заслуженному врачу РФ, директору ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России В.А. Солодкому за оказанную помощь в проведении данного исследования.

Acknowledgment. The authors would like to thank V.A. Solodky, MD, Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Honored Physician of the Russian Federation, Director of the Russian Scientific Center of Roentgenradiology of the Ministry of Health of Russia for his assistance in conducting this study.

Вклад авторов

Т.М. Кулинич: разработка концепции исследования, планирование экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов, редактирование;

Е.А. Кудинова, А.В. Иванов, А.М. Шишкин: планирование и проведение экспериментальных исследований, анализ результатов, написание текста статьи;

В.В. Каминский: планирование и проведение экспериментальных исследований;

О.Б. Князева: проведение и анализ экспериментальных исследований;

И.А. Пучков: планирование и проведение экспериментальных исследований, написание текста статьи;

В.К. Боженко: разработка плана исследований, формирование базы экспериментальных данных, анализ результатов, редактирование.

Authors' contributions

T.M. Kulinich: development of the research concept, planning of experimental studies, analysis and interpretation of results, editing;

E.A. Kudinova, A.V. Ivanov, A.M. Shishkin: planning and conducting experimental studies, analyzing the results, article writing;

V.V. Kaminsky: planning and conducting experimental research;

O.B. Knyazeva: conducting and analyzing experimental studies;

I.A. Puchkov: planning and conducting experimental research, article writing;

V.K. Bozhenko: development of a research plan, formation of a database of experimental data, analysis of results, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

А.В. Иванов / A.V. Ivanov: <https://orcid.org/0000-0001-6660-5895>

А.М. Шишкин / A.M. Shishkin: <https://orcid.org/0000-0003-4492-9543>

В.В. Каминский / V.V. Kaminsky: <https://orcid.org/0000-0001-8382-3579>

О.Б. Князева / O.B. Knyazeva: <https://orcid.org/0000-0001-8382-3579>

И.А. Пучков / I.A. Puchkov: <https://orcid.org/0009-0001-6651-8975>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Минздрава России.

Funding. The study was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of Russia.

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).

Исследование проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Russian Scientific Center of Roentgenradiology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 4 dated 26.04.2018).

The study was conducted in strict accordance with the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union dated 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Статья поступила: 27.09.2024. **Принята к публикации:** 20.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 27.09.2024. **Accepted for publication:** 20.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-67-75>

Клинико-лабораторное значение растворимой формы клаудина-5 и VEGF при раке яичников

Н.Е. Кушлинский^{1,2}, С.Е. Куликова^{2,3}, Ф.А. Гугнин^{2,3}, С.Ю. Нежданова², А.Н. Грачев¹, Д.О. Уткин³, Д.А. Цекатунов⁴, И.Б. Рыжавская⁴, Д.Н. Кушлинский⁴, Е.С. Герштейн^{1,2}, И.С. Стилиди¹

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

²ФГБОУ ВО «Российский университет медицины»; Россия, 127006 Москва, ул. Долгоруковская, 4;

³ГБУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 143515 Московская обл., п. Истра, 27;

⁴КГБУЗ «Краевой клинический центр онкологии» Минздрава Хабаровского края; Россия, 680035 Хабаровск, ул. Воронежская, 164

Контакты: Николай Евгеньевич Кушлинский biochimia@yandex.ru

Введение. Клаудин-5 относится к семейству трансмембранных белков, участвующих в формировании плотных межклеточных контактов, поддержании полярности клеток в эпителиальных и эндотелиальных слоях, регуляции проницаемости клеточных мембран и контроле передачи сигналов внутри клетки. Результаты немногочисленных исследований показывают, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) также влияет на формирование плотных контактов, в частности регулируя экспрессию клаудина-5. Помимо физиологических функций клаудин-5 и VEGF имеют большое значение в патогенезе различных заболеваний, в том числе злокачественных новообразований.

Цель исследования – изучить содержание клаудина-5 и VEGF в сыворотке крови больных раком яичников (РЯ) и провести анализ их клинической значимости.

Материалы и методы. Обследованы 123 больных РЯ (медиана возраста – 54 года) и 32 здоровые женщины группы контроля (медиана возраста – 54 года). Концентрацию клаудина-5 и VEGF в сыворотке крови определяли до начала лечения с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human CLDN5 (Claudin 5) ELISA Kit (Elabscience, Китай) и Human VEGF Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителей. Статистический анализ полученных результатов выполняли с использованием GraphPad Prism v. 10. Для сравнения показателей и оценки их взаимосвязей применяли непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ общей выживаемости проводили с помощью метода Каплана–Майера.

Результаты. Клаудин-5 выявлен в сыворотке крови 97 % больных РЯ и 94 % женщин группы контроля. Медиана (1-й квартиль (Q_1) – 3-й квартиль (Q_3)) содержания клаудина-5 в сыворотке крови здоровых женщин составила 0,77 (0,48–1,17) нг/мл, пациенток с РЯ – 0,95 (0,43–1,77) нг/мл. ROC-анализ информативности клаудина-5 при РЯ показал неудовлетворительную диагностическую точность модели (площадь под ROC-кривой (AUC) 0,613 (95 % доверительный интервал (ДИ) 0,513–0,713); $p = 0,049$): при медианном пороговом уровне 0,95 нг/мл тест обладал 50 % чувствительностью и 60 % специфичностью. VEGF выявлен у всех больных РЯ и здоровых женщин, медиана (Q_1 – Q_3) содержания VEGF в сыворотке крови здоровых женщин составила 45,6 (13,3–89,09) пг/мл и была статистически значимо ниже, чем у больных РЯ – 274,7 нг/мл (199,0–472,5). ROC-анализ для РЯ показал хорошую диагностическую точность модели (AUC 0,942 (95 % ДИ 0,886–0,997); $p < 0,0001$), позволяющую использовать уровень VEGF в сыворотке крови в качестве диагностического критерия. Наилучшие показатели чувствительности и специфичности (71 и 100 % соответственно) достигнуты при пороговом уровне VEGF 226,2 пг/мл. Содержание клаудина-5 и VEGF в сыворотке крови ассоциировано с показателями прогрессирования РЯ. При этом клаудин-5 и VEGF не являются статистически значимыми прогностическими маркерами данного заболевания.

Заключение. Уровни VEGF и клаудина-5 в сыворотке крови больных РЯ статистически значимо выше, чем у женщин группы контроля, и положительно коррелируют между собой. При этом у пациенток с РЯ VEGF обладает довольно хорошими диагностическими характеристиками по сравнению со здоровыми женщинами. Уровни VEGF и клаудина-5 ассоциированы с наличием отдаленных метастазов, что свидетельствует об их потенциальной роли в прогрессировании опухоли. Тем не менее на данном этапе исследований эти маркеры не могут быть рекомендованы в качестве диагностических или прогностических критериев при РЯ и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: рак яичников, клаудин-5, фактор роста эндотелия сосудов, сыворотка крови, диагностика рака яичников, прогноз заболевания

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Куликова С.Е., Гугнин Ф.А. и др. Клинико-лабораторное значение растворимой формы клаудина-5 и VEGF при раке яичников. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):67–75.
DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-67-75>

Clinical and laboratory significance of soluble claudin-5 and VEGF in ovarian cancer

N.E. Kushlinskii^{1,2}, S.E. Kulikova^{2,3}, F.A. Gugin^{2,3}, S.Yu. Nezhdanova², A.N. Gratchev¹, D.O. Utkin³, D.A. Tsekatunov⁴, I.B. Ryzhavskaia⁴, D.N. Kushlinskii⁴, E.S. Gershtein^{1,2}, I.S. Siilidi¹

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

²Russian University of Medicine; 4 Dolgorukovskaya St., Moscow 127006, Russia;

³Moscow City Oncological Hospital No. 62, Moscow Healthcare Department; 27 Istra, Moscow Region 143515, Russia;

⁴Regional Clinical Oncology Center, Ministry of Health of the Khabarovsk Territory Russia; 164 Voronezhskaya St., Khabarovsk 680035, Russia

Contacts: Nikolai Evgenievich Kushlinskii biochimia@yandex.ru

Introduction. Claudin 5 belongs to a family of transmembrane proteins mediating formation of tight junctions between cells, maintenance of cell polarity in epithelial and endothelial layers, regulation of cell membrane permeability, and control of signal transduction inside the cells. Results of a small number of studies show that vascular endothelial growth factor (VEGF) also affects formation of tight junctions, in particular through regulation of claudin 5 expression. In addition to their physiological functions, claudin 5 and VEGF play an important role in pathogenesis of various diseases including malignant neoplasms.

Aim. To study the levels of claudin 5 and VEGF in serum of patients with ovarian cancer and evaluate their clinical significance.

Materials and methods. In total, 123 patients with ovarian cancer (median age 54 years) and 32 control group healthy women (median age 54 years) were examined. Claudin 5 and VEGF levels in serum were measured prior to treatment using Human CLDN5 (Claudin 5) ELISA Kit (Elabscience, China) and Human VEGF Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Statistical analysis of the obtained data was performed using the GraphPad Prism v. 10 software. The values were compared and their correlations quantified using nonparametric Mann–Whitney, Kruskal–Wallis tests and Spearman's rank correlation coefficient. Overall survival was analyzed using the Kaplan–Meier method.

Results. Claudin 5 was found in serum of 97 % of patients with ovarian cancer and 94 % of the control group women. Median (1st quartile (Q₁) – 3rd quartile (Q₃)) level of claudin 5 in serum of healthy women was 0.77 (0.48–1.17) ng/mL, patients with ovarian cancer – 0.95 (0.43–1.77) mg/mL. ROC analysis of informational value of claudin 5 in ovarian cancer showed unsatisfactory diagnostic accuracy of the model (area under the ROC curve (AUC) 0.613 (95 % confidence interval (CI) 0.513–0.713); $p = 0.049$); for median threshold value of 0.95 ng/mL the assay had sensitivity of 50 % and specificity of 60 %. VEGF was found in all patients with ovarian cancer and healthy women; median (Q₁–Q₃) VEGF level in serum of healthy women was 45.6 (13.3–89.09) pg/mL and was statistically significantly lower than in patients with ovarian cancer: 274.7 ng/mL (199.0–472.5). ROC analysis for ovarian cancer showed good diagnostic accuracy of the model (AUC 0.942 (95 % CI 0.886–0.997); $p < 0.0001$) which allows to use serum VEGF level as a diagnostic criterion. The best results for sensitivity and specificity (71 and 100 %, respectively) were obtained at VEGF threshold level of 226.2 pg/mL. Serum claudin 5 and VEGF levels are associated with ovarian cancer progression. However, claudin 5 and VEGF are not statistically significant prognostic markers for this disease.

Conclusion. Serum levels of VEGF and claudin 5 in patients with ovarian cancer are significantly higher than in control group women and positively correlate with each other. Additionally, VEGF has relatively good diagnostic characteristics compared to healthy women of the control group. VEGF and claudin 5 levels are associated with the presence of distant metastases which points at their potential role in tumor progression. However, at this research stage, these markers cannot be recommended as diagnostic or prognostic criteria in ovarian cancer and require further study.

Keywords: ovarian cancer, claudin 5, vascular endothelial growth factor, blood serum, ovarian cancer diagnosis, disease prognosis

For citation: Kushlinskii N.E., Kulikova S.E., Gugin F.A. et al. Clinical and laboratory significance of soluble claudin-5 and VEGF in ovarian cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):67–75. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-67-75>

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников (РЯ) — одно из самых опасных онкогинекологических заболеваний, на ранних стадиях часто протекающее бессимптомно. Каждый год в мире выявляют около 300 тыс. новых случаев РЯ, и, несмотря на то, что этот вид рака занимает лишь 8-е место по частоте заболеваемости у женщин, он стоит на 5-м месте по уровню смертности [1]. Нормальная тканевая архитектура, в том числе поддерживаемая посредством клеточных контактов, играет ключевую роль в развитии и прогрессии солидных опухолей, включая РЯ. В нормальных эпителиальных клетках межклеточные контакты обеспечивают структурную целостность тканей, регулируют межклеточную адгезию и препятствуют бесконтрольной миграции клеток. Однако при злокачественной трансформации происходит нарушение целостности контактов, что способствует приобретению опухолевыми клетками локомоторного и инвазивного фенотипов [2, 3].

Одним из важных компонентов клеточных контактов является клаудин-5, относящийся к семейству клаудинов — ключевых белков плотных контактов (tight junctions, TJ) [4]. В норме он участвует в формировании барьеров между клетками, регулируя проницаемость эндотелия и эпителия. При РЯ его экспрессия может изменяться, что способствует дисфункции клеточных контактов и облегчает распространение опухолевых клеток [5, 6].

Показано, что дисрегуляция клаудина-5 ассоциирована с повышенной агрессивностью опухоли, увеличением подвижности клеток и их способностью к инвазии и метастазированию, что делает его потенциальной мишенью для терапии [7, 8]. Кроме того, уровень экспрессии данного белка рассматривается как возможный биомаркер для оценки прогноза онкологических заболеваний и эффективности терапии [9].

Ключевую роль в ангиогенезе играет также фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Он стимулирует рост сосудов, а также способствует выживанию эндотелиальных клеток. VEGF стимулирует пролиферацию, миграцию и проницаемость эндотелиальных клеток, что приводит к образованию сосудистых структур, а также усиливает их проницаемость. При онкологических заболеваниях повышенный уровень этого фактора ассоциируется с агрессивным поведением опухолей и неблагоприятным прогнозом [10, 11].

Результаты немногочисленных исследований показывают, что VEGF влияет на формирование плотных межклеточных контактов, в частности регулируя экспрессию клаудина-5. Его активация запускает сигнальные пути в эндотелиальных клетках, что может привести к нарушению межклеточных контактов, включая снижение уровня клаудина-5. Это в свою очередь способствует повышению проницаемости сосудов, что играет роль как в нормальных физиологических процессах, так и в опухолевом росте [12]. Показано, что VEGF усиливает сосудистую проницаемость, в том

числе за счет воздействия на клаудин-5 [13]. В контексте опухолевой прогрессии эти два белка взаимодействуют, способствуя как неоваскуляризации, так и изменениям сосудистой проницаемости. VEGF может снижать экспрессию клаудина-5, что приводит к ослаблению барьерной функции эндотелия и облегчает метастазирование опухолевых клеток [14].

Цель исследования — анализ содержания растворимых форм клаудина-5 и VEGF в сыворотке крови при РЯ и оценка их клинической значимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 123 первичных, ранее не леченных, пациенток с РЯ (медиана возраста — 54 года), которым выполнены обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина, отделении онкогинекологии Московской городской онкологической больницы № 62, отделении онкогинекологии Краевого клинического центра онкологии г. Хабаровска, и 32 здоровые женщины (медиана возраста — 54 года). Клинический диагноз всех больных подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей яичников, принятой Всемирной организацией здравоохранения в 2014 г.

В исследование включены пациентки с эпителиальным РЯ 3 гистологических типов: серозным (95 случаев), эндометриоидным (20 случаев) и муцинозным (8 случаев). В табл. 1 представлена характеристика исследуемой выборки.

Концентрации клаудина-5 и VEGF определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human CLDN5 (Claudin 5) ELISA Kit (Elabscience, Китай) и Human VEGF Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителей. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание клаудина-5 выражали в нанограммах (нг), VEGF — в пикограммах (пг) на 1 мл сыворотки крови.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью GraphPad Prism v. 10. Для сравнения показателей и оценки их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ общей выживаемости проводили по методу Каплана–Майера на всей выборке в целом, независимо от гистологического типа опухоли и стадии заболевания. Сравнение значимости различий выживаемости выполняли с помощью *log-rank*-теста. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных раком яичников

Table 1. Clinical and morphological characteristics of ovarian cancer patients

Показатель Parameter	Число пациенток, n (%) Number of patients, n (%)
Гистологический тип опухоли: Histological type of tumor:	
серозный serous	95 (77)
эндометриоидный endometrioid	20 (16)
муцинозный mucinous	8 (7)
Стадия: Stage:	
I–II	36 (29)
III–IV	87 (71)
Размер опухоли: Tumor size:	
T1–2	23 (19)
T3–4	100 (81)
Наличие регионарных метастазов: Nodal status:	
N0	99 (80)
N+	24 (20)
Наличие отдаленных метастазов: Metastasis:	
M0	105 (85)
M1	18 (15)
Степень злокачественности (серозный рак): Grade (serous cancer):	
низкая low grade	11 (12)
высокая high grade	84 (88)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клаудин-5 обнаружен в сыворотке крови 119 (97 %) из 123 больных РЯ и 30 (94 %) из 32 здоровых женщин группы контроля. Медиана (1-й квартиль (Q_1)–3-й квартиль (Q_3)) содержания клаудина-5 в сыворотке крови здоровых женщин составила 0,77 (0,48–1,17) нг/мл, пациенток с РЯ – 0,95 (0,43–1,77) нг/мл ($p < 0,05$) (рис. 1).

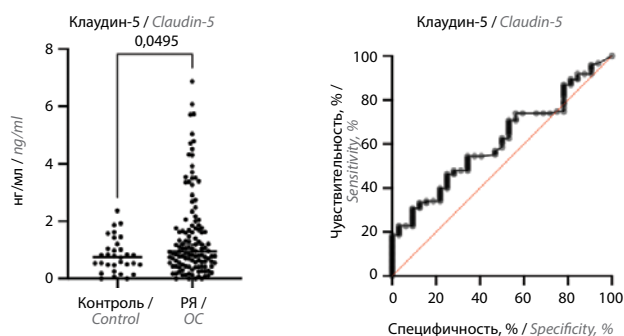
**Рис. 1.** Сравнительный анализ содержания клаудина-5 в сыворотке крови больных раком яичников (РЯ) и женщин группы контроля. ROC-анализ информативности клаудина-5 у больных РЯ и женщин группы контроля

Fig. 1. Comparative analysis of claudin-5 levels in patients with ovarian cancer (OC) and women of the control group. ROC analysis of claudin-5 diagnostic value in OC patients and women of control group

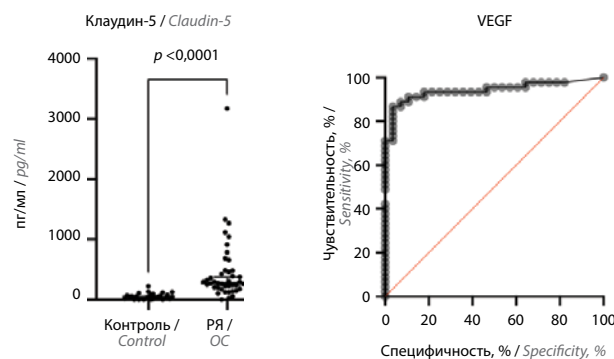
**Рис. 2.** Сравнительный анализ содержания фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) у больных раком яичников (РЯ) и здоровых доноров. ROC-анализ для VEGF у больных РЯ относительно женщин группы контроля

Fig. 2. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in OC patients and healthy donors. ROC analysis of VEGF diagnostic value in with OC patients and women of control group

ROC-кривая для злокачественных опухолей яичников показывает неудовлетворительную диагностическую точность модели (AUC 0,613 (95 % доверительный интервал (ДИ) 0,513–0,713); $p = 0,049$), не позволяющую использовать уровень клаудина-5 в сыворотке крови в качестве надежного диагностического критерия для РЯ: наилучшее соотношение чувствительности и специфичности (55 и 66 % соответственно) достигается при пороговом уровне 0,85 нг/мл, в то время как при медианном пороговом уровне, равном 0,95 нг/мл, тест обладает 50 % чувствительностью и 60 % специфичностью.

Медиана (Q_1 – Q_3) содержания VEGF в сыворотке крови здоровых женщин составила 45,63 (13,3–89,09) пг/мл, что статистически значимо ниже, чем в группе больных РЯ – 274,7 (199,0–472,5) пг/мл ($p < 0,0001$) (рис. 2).

Результаты ROC-анализа показали хорошую диагностическую точность модели (AUC 0,942 (95 % ДИ 0,886–0,997); $p < 0,0001$), позволяющую использовать уровень VEGF в сыворотке крови в качестве диагностического критерия для РЯ. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности (71 и 100 % соответственно) достигается при пороговом уровне 226,2 пг/мл, в то время как при медианном пороговом уровне, равном 274,7 пг/мл, тест обладает всего лишь 50 % чувствительностью и 100 % специфичностью.

Результаты корреляционного анализа уровней исследуемых белков в сыворотке крови с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена показали, что уровни растворимых форм клаудина-5 и VEGF статистически значимо положительно коррелируют между собой ($r_s = 0,930$; $p < 0,0001$) (рис. 3), что может свидетельствовать о тесной взаимосвязи этих двух белков в контексте поддержания барьерной функции эндотелиальных клеток и регуляции проницаемости сосудов.

Далее проведен анализ клинической значимости клаудина-5 и VEGF при РЯ. Его результаты представлены в табл. 2 и 3.

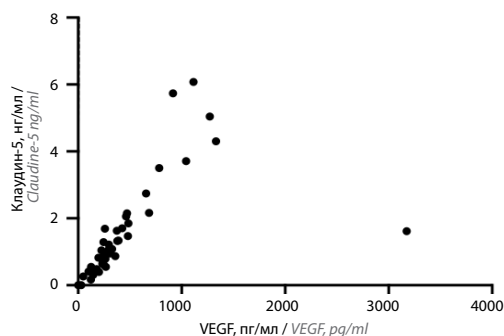


Рис. 3. Корреляционный анализ уровней клаудина-5 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови больных раком яичников
Fig. 3. Correlation analysis between claudin-5 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in blood serum of ovarian cancer patients

Содержание клаудина-5 в сыворотке крови повышено при наличии отдаленных метастазов РЯ: медиана его содержания в 2 раза выше у пациенток с распространенным опухолевым процессом ($p = 0,012$). В то же время ассоциации содержания клаудина-5 со стадией заболевания и наличием регионарных метастазов не выявлено, что косвенно указывает на его вовлеченность только в процесс распространения опухолевых клеток в отдаленные очаги.

Уровень VEGF не зависит от возраста пациенток и гистологического типа опухоли. Его содержание несколько выше на поздних стадиях заболевания по сравнению с ранними стадиями, но различия статистически незначимы. У пациенток с регионарными и отдален-

Таблица 2. Содержание клаудина-5 в сыворотке крови больных раком яичников в зависимости от клинических и морфологических характеристик заболевания
Table 2. Claudin-5 levels in blood serum of ovarian cancer patients depending on clinical and morphological characteristics of the disease

Показатель Parameter	Клаудин-5, нг/мл Claudine-5, ng/ml		
	Me	Q_1-Q_3	p
Возраст, лет: Age, years: ≤54 >54	0,97 0,88	0,44–1,62 0,43–2,34	0,578
Гистологический тип опухоли: Histological type of tumor: серозный serous эндометриоидный endometrioid муцинозный mucinous	0,93 0,94 2,19	0,43–1,66 0,29–3,48 0,57–3,47	0,484
Стадия: Stage: I–II III–IV	0,81 1,04	0,49–1,73 0,43–1,85	0,492
Размер опухоли: Tumor size: T1–2 T3–4	0,79 1,08	0,41–1,64 0,50–1,86	0,240
Регионарные метастазы: Nodal status: N0 N+	0,89 1,04	0,43–1,76 0,70–1,86	0,443
Отдаленные метастазы: Distant metastases: M0 M+	0,85 1,74	0,43–1,64 0,97–2,94	0,012*
Степень злокачественности (серозный рак): Grade (serous cancer): низкая low grade высокая high grade	0,78 0,94	0,31–1,21 0,49–1,75	0,248

*Различия статистически значимы.

Примечание. Здесь и в табл. 3: Q_1 – 1-й квартиль; Q_3 – 3-й квартиль.

*The differences are statistically significant.

Note. Here and in table 3: Q_1 – the 1st quartile; Q_3 – the 3rd quartile.

Таблица 3. Содержание фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови больных раком яичников в зависимости от клинических и морфологических показателей

Table 3. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in blood serum of ovarian cancer patients depending on clinical and morphological indicators

Показатель Parameter	Уровень VEGF, пг/мл VEGF level, pg/ml		
	Me	Q ₁ –Q ₃	p
Возраст, лет: Age, years: ≤54 >54	274,7 281,8	179,9–390,6 228,4–664,4	0,518
Гистологический тип опухоли: Histological type of tumor: серозный serous эндометриоидный endometrioid муцинозный mucinous	296,8 259,0 264,9	225,2–477,2 125,0–1115 105,3–476,6	0,722
Стадия: Stage: I–II III–IV	249,8 302,0	179,9–358,6 232,5–528,7	0,168
Размер опухоли: Tumor size: T1–2 T3–4	265,3 296,8	184,0–345,8 229,9–571,7	0,207
Регионарные метастазы: Nodal status: N0 N+	249,8 571,7	176,4–368,9 401,0–1125	0,0009*
Отдаленные метастазы: Distant metastases: M0 M+	249,8 571,7	173–358,6 354,7–1101	0,0015*
Степень злокачественности: Grade: низкая low высокая high	227,2 296,8	171,4–343,7 229,9–483,9	0,300

*Различия статистически значимы.
*The differences are statistically significant.

ными метастазами уровень VEGF значительно и статистически значимо выше, чем у больных без них, что подтверждает большое значение VEGF в опухолевой прогрессии. Таким образом, полученные данные указывают на потенциальную роль VEGF в качестве маркера опухолевой прогрессии при РЯ.

Для анализа отдаленных результатов лечения (показателей общей выживаемости) больных разделили на 2 группы сравнения в зависимости от содержания маркеров – выше или ниже медианы (0,95 нг/мл – для клаудина-5 и 274,7 пг/мл – для VEGF). Общая выживаемость больных РЯ представлена на рис. 4.

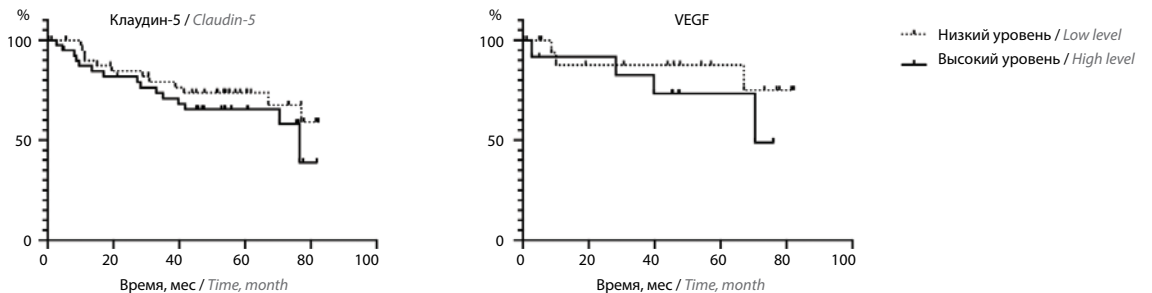


Рис. 4. Общая выживаемость больных раком яичников в зависимости от медианы содержания клаудина-5 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови

Fig. 4. Overall survival of ovarian cancer patients depending on the median levels of claudin-5 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in blood serum

Установлено, что клаудин-5 и VEGF не являются статистически значимыми прогностическими маркерами РЯ (отношение рисков 1,49; $p = 0,296$ и отношение рисков 2,15; $p = 0,303$ соответственно). Однако стоит отметить, что медиана выживаемости больных РЯ при уровнях клаудина-5 и VEGF выше медианы составила 76 и 70 мес соответственно, в то время как при более низком их содержании не была достигнута за весь период наблюдения (>80 мес).

ОБСУЖДЕНИЕ

Клаудин-5 — трансмембранный белок, входящий в семейство клаудинов, которые являются основными компонентами плотных межклеточных контактов. В норме клаудин-5 преимущественно экспрессируется в эндотелиальных клетках, формирующих сосудистый барьер, особенно гематоэнцефалический барьер. Его основная функция — ограничение парацеллюлярного транспорта, что важно для поддержания гомеостаза органов, таких как головной мозг. Клаудин-5 также участвует в сохранении механической целостности тканей, препятствуя бесконтрольной миграции клеток [15].

При онкологических заболеваниях экспрессия клаудина-5 меняется, однако характер ее изменения зависит от типа опухоли. Во многих солидных опухолях, таких как рак молочной железы, шейки матки и немелкоклеточный рак легкого, уровень экспрессии этого белка ниже, чем в нормальных тканях. Однако в случае глиобластомы, аденокарциномы поджелудочной железы и феохромоцитомы уровень экспрессии клаудина-5 в опухоли повышен [6]. Стоит отметить, что экспрессия этого белка при солидных опухолях в большинстве опубликованных исследований определялась с помощью полимеразной цепной реакции или иммуногистохимического исследования, что подтверждает значимость тканевой экспрессии данного белка.

Мы изучили растворимую форму клаудина-5 в сыворотке крови больных РЯ и выявили, что сывороточный уровень этого белка значимо выше у больных РЯ по сравнению со здоровыми женщинами контрольной группы. Обнаружен более высокий уровень клаудина-5 у пациенток с отдаленными метастазами. Возможно, увеличение содержания растворимой формы данного белка способствует приобретению опухолевыми клетками подвижности, необходимой для отдаленного метастазирования, однако данная гипотеза требует дальнейших исследований.

Также мы проанализировали содержание ключевого регулятора ангиогенеза VEGF в сыворотке крови больных РЯ и здоровых женщин. Уровень данного белка в сыворотке крови больных РЯ оказался в 5 раз выше, чем у женщин контрольной группы, что подтверждается результатами других исследований различных солидных опухолей [16]. Уровень экспрессии VEGF также был повышен при наличии регионарных и отдаленных метастазов, что соответствует опубликованным данным [17]. Известно, что высокий уровень

VEGF ассоциирован с неблагоприятным прогнозом, например при гепатоцеллюлярной карциноме [18], немелкоклеточном раке легкого [19], а также при РЯ [20]. Однако в ходе анализа прогностической значимости VEGF и клаудина-5 не выявлена такая зависимость для этих белков, что, возможно, связано с относительно небольшим числом обследованных пациенток.

Прогностическая значимость клаудина-5 на сегодняшний день также неясна. Показано, что при дисфункции [21] и раке молочной железы [22], аденокарциноме поджелудочной железы [23], плоскоклеточном раке легкого, мезотелиоме, аденокарциноме желудка и увеальной меланоме высокая экспрессия клаудина-5 ассоциирована с худшими показателями общей выживаемости, в то время как при глиобластоме, гепатоцеллюлярной карциноме, аденокарциноме предстательной железы, раке щитовидной железы и тела матки высокая экспрессия этого белка, наоборот, коррелирует с более высокими показателями выживаемости [6, 24]. Высокая тканевая экспрессия клаудина-5 также является неблагоприятным прогностическим маркером в случае серозного РЯ [8]. В нашем исследовании при повышенном уровне растворимой формы данного белка также выявлена тенденция к неблагоприятному влиянию на общую выживаемость больных РЯ.

Корреляционный анализ содержания клаудина-5 и VEGF в сыворотке крови выявил значимую положительную связь между ними, что позволяет предположить синергию в механизмах их действия. Поскольку VEGF регулирует сосудистую проницаемость и ангиогенез, а клаудин-5 участвует в барьерной функции сосудов, тесная корреляция этих белков может указывать на то, что они способствуют изменению проницаемости сосудистой стенки; это важно для понимания механизмов, лежащих в основе различных сосудистых нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования выявлено, что растворимые формы клаудина-5 и VEGF определяются в сыворотке крови большинства больных РЯ и демонстрируют значимую корреляцию между собой. Уровень обоих маркеров был выше у пациенток с отдаленными метастазами, что указывает на их возможную роль в распространении опухолевого процесса. VEGF, в свою очередь, продемонстрировал высокую диагностическую значимость, что позволяет рассматривать его как потенциальный биомаркер опухолевой прогрессии при РЯ.

Однако в ходе исследования не выявлена статистически значимая прогностическая ценность изучаемых маркеров. Несмотря на обнаруженную связь между клаудином-5 и VEGF, их диагностическое и прогностическое значение требует дальнейшего изучения. Необходимы исследования с участием большего числа пациентов и анализ молекулярных механизмов их взаимодействия.

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

- Burke W., Barkley J., Barrows E. et al. Executive summary of the ovarian cancer evidence review conference. *Obstet Gynecol* 2023;142(1):179–95. DOI: 10.1097/AOG.0000000000005211
- Schwager S.C., Taufalele P.V., Reinhart-King C.A. Cell-cell mechanical communication in cancer. *Cell Mol Bioeng* 2019;12(1):1–14. DOI: 10.1007/s12195-018-00564-x
- Dominiak A., Chelstowska B., Olejarz W., Nowicka G. Communication in the cancer microenvironment as a target for therapeutic interventions. *Cancers (Basel)* 2020;12(5):1232. DOI: 10.3390/cancers12051232
- Бойчук С.В., Бикиниева Ф.Ф., Копнин П.Б. Белки семейства клаудинов и их роль в патогенезе и терапии злокачественных новообразований: состояние проблемы и перспективы. *Российский онкологический журнал* 2024;29(3):258–77. DOI: 10.17816/onco636917
Boichuk S.V., Bikinieva F.F., Kopnin P.B. The claudin family of proteins in the pathogenesis and treatment of malignancies: current insights and future prospects. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal = Russian Oncological Journal* 2024;29(3):258–77. (In Russ.). DOI: 10.17816/onco636917
- Greene C., Hanley N., Campbell M. Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS* 2019;16(1):3. DOI: 10.1186/s12987-019-0123-z
- Ling Y., Kang X., Yi Y. et al. CLDN5: from structure and regulation to roles in tumors and other diseases beyond CNS disorders. *Pharm Res* 2024;200:107075. DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107075
- Huang S., Zhang J., Li Y. et al. Downregulation of claudin 5 promotes malignant progression and radioresistance through Beclin1-mediated autophagy in esophageal squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2023;21(1):379. DOI: 10.1186/s12967-023-04248-7
- Turunen M., Talvensaari-Mattila A., Soini Y., Santala M. Claudin-5 overexpression correlates with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2009;29(12):5185–9.
- Hana C., Thaw Dar N.N., Galo Venegas M., Vulfovich M. Claudins in cancer: a current and future therapeutic target. *Int J Mol Sci* 2024;25(9):4634. DOI: 10.3390/ijms25094634
- Goel H.L., Mercurio A.M. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013;13(12):871–82. DOI: 10.1038/nrc3627
- Ghalebandi S., Yuzugulen J., Pranjal M.Z.I., Pourgholami M.H. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol* 2023;949:175586. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175586
- Laakkonen J.P., Lappalainen J.P., Theelen T.L. et al. Differential regulation of angiogenic cellular processes and claudin-5 by histamine and VEGF via PI3K-signaling, transcription factor SNAI2 and interleukin-8. *Angiogenesis* 2017;20(1):109–24. DOI: 10.1007/s10456-016-9532-7
- Herr D., Sallmann A., Bekes I. et al. VEGF induces ascites in ovarian cancer patients via increasing peritoneal permeability by downregulation of Claudin 5. *Gynecol Oncol* 2012;127(1):210–6. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.05.002
- Bekes I., Friedl T.W., Kohler T. et al. Does VEGF facilitate local tumor growth and spread into the abdominal cavity by suppressing endothelial cell adhesion, thus increasing vascular peritoneal permeability followed by ascites production in ovarian cancer? *Mol Cancer* 2016;15:13. DOI: 10.1186/s12943-016-0497-3
- Hashimoto Y., Greene C., Munnich A., Campbell M. The CLDN5 gene at the blood-brain barrier in health and disease. *Fluids Barriers CNS* 2023;20(1):22. DOI: 10.1186/s12987-023-00424-5
- Kut C., Mac Gabhann F., Popel A.S. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *British J Cancer* 2007;97(7):978–85. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603923
- Komatsu H., Oishi T., Itamochi H. et al. Serum vascular endothelial growth factor – a as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017;27(7):1325–32. DOI: 10.1097/IGC.0000000000001027
- Lacin S., Yalcin S. The Prognostic value of circulating VEGF-A level in patients with hepatocellular cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2020;19:1533033820971677. DOI: 10.1177/1533033820971677
- Kaya A., Ciledag A., Gulbay B.E. et al. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004;98(7):632–6. DOI: 10.1016/j.rmed.2003.12.017
- Trifanescu O.G., Gales L.N., Tanase B.C. et al. Prognostic role of vascular endothelial growth factor and correlation with oxidative stress markers in locally advanced and metastatic ovarian cancer patients. *Diagnostics (Basel)* 2023;13(1):166. DOI: 10.3390/diagnostics13010166
- Круглова Н.М., Маркова А.Г. Плотные контакты в эпителии молочной железы: возможная роль в развитии ее дисфункций. *Молекулярная медицина* 2015;3:3–7.
Kruglova N.M., Markova A.G. Tight contacts in the mammary gland epithelium: a possible role in the development of its dysfunctions. *Molekulyarnaya medicina = Molecular Medicine* 2015;3:3–7. (In Russ.).
- Escudero-Esparza A., Jiang W.G., Martin T.A. Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31(1):43. DOI: 10.1186/1756-9966-31-43
- Soini Y., Eskelinen M., Juvonen P. et al. Strong claudin 5 expression is a poor prognostic sign in pancreatic adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2014;35(4):3803–8. DOI: 10.1007/s13277-013-1503-7
- Sakaguchi T., Suzuki S., Higashi H. et al. Expression of tight junction protein claudin-5 in tumor vessels and sinusoidal endothelium in patients with hepatocellular carcinoma. *J Surg Res* 2008;147(1):123–31. DOI: 10.1016/j.jss.2007.07.013

Вклад авторов

Н.Е. Кушлинский, А.Н. Грачев, Е.С. Герштейн: разработка дизайна исследования, планирование исследования, написание текста статьи;
С.Е. Куликова, Д.А. Цекатунов, И.Б. Рыжавская, Д.Н. Кушлинский: анализ полученных данных;
Ф.А. Гугнин, С.Ю. Нежданова, Д.О. Уткин: получение данных для анализа;
И.С. Стилиди: обсуждение дизайна исследования, анализ результатов.

Authors' contributions

N.E. Kushlinskii, A.N. Gratchev, E.S. Gershtein: development of the design of the study, planning the study, article writing;
S.E. Kulikova, D.A. Tsekatonov, I.B. Ryzhavskaia, .N. Kushlinskii: analysis of the obtained data;
F.A. Gugnin, S.Yu. Nezhdanova, D.O. Utkin: obtaining data for analysis;
I.S. Stilidi: discussion of study design and analysis of the results.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinskii: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

С.Е. Куликова / S.E. Kulikova: <https://orcid.org/0009-0000-1463-4563>

Ф.А. Гугнин / F.A. Guginin: <https://orcid.org/0009-0007-5435-2123>

С.Ю. Нежданова / S.Yu. Nezhdanova: <https://orcid.org/0009-0000-8746-7217>

А.Н. Грачев / A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>

Д.О. Уткин / D.O. Utkin: <https://orcid.org/0000-0002-6620-2073>

Д.А. Цекатунов / D.A. Tsekatunov: <https://orcid.org/0009-0007-1561-9681>

И.Б. Рыжавская / I.B. Ryzhavskaya: <https://orcid.org/0009-0005-7572-6118>

Д.Н. Кушлинский / D.N. Kushlinskiy: <https://orcid.org/0000-0003-1490-8418>

Е.С. Герштейн / E.S. Gershtein: <https://orcid.org/0000-0002-3321-801X>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

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 «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of 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.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-76-83>

Особенности копийности митохондриальных генов и транскриптов микроРНК в плазме крови больных аденокарциномой эндометрия и миомой

О.И. Кит, Е.М. Франциянц, И.В. Каплиева, Д.С. Кутилин, И.В. Нескубина, В.А. Бандовкина, Л.К. Трепитаки, Е.И. Сурикова

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

Контакты: Лидия Константиновна Трепитаки legolab69@yandex.ru

Введение. На развитие злокачественных опухолей тела матки влияет множество факторов, включая нарушения в митохондриальном геноме. Аномалии в регуляции митохондриального генома приводят к снижению окислительного фосфорилирования, а также к ингибированию митохондриального пути апоптоза. Для разработки эффективных малоинвазивных методов диагностики аденокарциномы эндометрия и миомы необходим скрининг молекулярных маркеров в плазме крови. Такими маркерами могут быть показатель числа копий генов и уровень транскриптов микроРНК. Данные показатели обладают достаточной стабильностью во внеклеточных средах организма человека, в том числе в плазме крови.

Цель исследования – выявление молекулярных малоинвазивных дифференциальных маркеров для аденокарциномы эндометрия и миомы.

Материалы и методы. Проведены лабораторные исследования показателя копийности генов и уровней транскриптов микроРНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в плазме крови 26 больных аденокарциномой эндометрия, 14 больных миомой и 20 условно здоровых женщин.

Результаты. Обнаружены статистически значимые различия ($p < 0,05$) в уровне копийности генов *HV2* и *MT-ND1*, а также в уровнях транскриптов микроРНК *hsa-miR-122-5p* и *hsa-miR-7106-5p* у пациенток с аденокарциномой эндометрия и миомой, только аденокарциномой эндометрия и условно здоровых женщин. В плазме крови больных аденокарциномой эндометрия копийность *HV2* и *MT-ND1* была ниже в 1,5 ($p < 0,005$) и 1,4 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению с больными миомой и в 1,5 раза по сравнению с условно здоровыми женщинами. В плазме крови пациенток с аденокарциномой эндометрия уровень транскриптов микроРНК *hsa-miR-122-5p* ($p < 0,005$) и *hsa-miR-7106-5p* ($p < 0,005$) был меньше в 8,9 и 3,9 раза соответственно относительно этого показателя у больных миомой. В плазме крови пациенток с аденокарциномой эндометрия уровень транскриптов микроРНК *hsa-miR-143-5p*, *hsa-miR-122-5p* и *hsa-miR-7106-5p* оказался в 2,1 ($p < 0,005$), 10,8 ($p < 0,005$) и 5,2 ($p < 0,005$) раза ниже соответственно, чем данный параметр у условно здоровых женщин.

Заключение. Полученные данные о дифференциальных различиях в копийности *HV2*, *MT-ND1*, уровнях транскриптов микроРНК *hsa-miR-122-5p* и *hsa-miR-7106-5p* в плазме крови пациенток с аденокарциномой эндометрия и миомой имеют значительный потенциал для совершенствования малоинвазивной диагностики этих заболеваний.

Ключевые слова: копийность генов, микроРНК, митохондриальная дисфункция, аденокарцинома эндометрия, миома, малоинвазивная диагностика

Для цитирования: Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В. и др. Особенности копийности митохондриальных генов и транскриптов микроРНК в плазме крови больных аденокарциномой эндометрия и миомой. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):76–83.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-76-83>

Features of mitochondrial genes copy numbers and microRNA transcripts in endometrial adenocarcinoma and fibroids patients blood plasma

O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, I.V. Kaplieva, D.S. Kutilin, I.V. Nes kubina, V.A. Bandovkina, L.K. Trepitaki, E.I. Surikova

National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line St., Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Lidiya Konstantinovna Trepitaki legolab69@yandex.ru

Introduction. The development of malignant tumors of the uterine body is influenced by many factors, including disturbances in the mitochondrial genome. Abnormalities in the regulation of the mitochondrial genome lead to a decrease in oxidative phosphorylation, as well as inhibition of the mitochondrial apoptosis pathway. To develop effective minimally invasive methods for diagnosing endometrial adenocarcinoma and fibroids, screening of molecular markers in blood plasma is necessary. Such markers may be the gene copy number and the levels of microRNA transcripts. These indicators are sufficiently stable in the extracellular environments of the human body, including blood plasma.

Aim. To identify molecular minimally invasive differential markers for endometrial adenocarcinoma and fibroids.

Materials and methods. Laboratory studies of the gene copy number and the levels of microRNA transcripts were carried out using real-time polymerase chain reaction in the blood plasma of 26 patients with endometrial adenocarcinoma, 14 fibroids patients and 20 conditionally healthy women.

Results. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found in the copy number of the *HV2* and *MT-ND1* genes, as well as in the levels of microRNA transcripts hsa-miR-122-5p and hsa-miR-7106-5p in patients with endometrial adenocarcinoma and fibroids, in patients with endometrial adenocarcinoma and conditionally healthy women. In the blood plasma of patients with endometrial adenocarcinoma, the copy number of *HV2* and *MT-ND6* was lower by 1.5 ($p < 0.005$) and 1.4 ($p < 0.05$) times, respectively, compared to the level in patients with fibroids, and 1.5 times lower than the level in conditionally healthy women. In the blood plasma of patients with endometrial adenocarcinoma, the levels of microRNA transcripts hsa-miR-122-5p ($p < 0.005$) and hsa-miR-7106-5p ($p < 0.005$) was lower by 8.9 and 3.9 times, respectively, relative to the levels in patients with fibroids. In the blood plasma of endometrial adenocarcinoma patients, the levels of hsa-miR-143-5p, hsa-miR-122-5p and hsa-miR-7106-5p microRNA transcripts was 2.1 ($p < 0.005$), 10.8 ($p < 0.005$) and 5.2 ($p < 0.005$) times lower, respectively, than the levels in conditionally healthy women.

Conclusion. The obtained data on differential differences in the copy number of *HV2*, *MT-ND1*, the levels of hsa-miR-122-5p and hsa-miR-7106-5p microRNA transcripts in the blood plasma of patients with endometrial adenocarcinoma and myoma have significant potential for improving minimally invasive diagnostics of these diseases.

Keywords: gene copy number, microRNA, mitochondrial dysfunction, endometrial adenocarcinoma, fibroids, minimally invasive diagnostics

For citation: Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V. et al. Features of mitochondrial genes copy numbers and microRNA transcripts in endometrial adenocarcinoma and fibroids patients blood plasma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2025;12(1):76–83. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-76-83>

ВВЕДЕНИЕ

Большую роль в развитии злокачественных опухолей тела матки — самых распространенных опухолей органов малого таза у женщин — могут играть гиперэстрогения эндогенного или экзогенного происхождения, нарушения регуляции клеточного цикла, апоптоза и митохондриального генома. Действие эстрогенов на организм реализуется через взаимодействие с их рецепторами, активирующими гены-мишени в различных тканях [1]. Аномалии в регуляции митохондриального генома приводят к снижению окислительного фосфорилирования, а также к ингибированию митохондриального пути апоптоза [2]. Исходя из вышесказанного, важно понимать особенности молекулярного патогенеза аденокарциномы эндометрия, в частности особенности регуляции митохондриального генома.

В этом аспекте исследование показателей копийности генов (copy number variation, CNV) и уровней транскриптов микроРНК имеет большой потенциал. CNV представляет собой особую форму генетической вариативности, отражающую число копий гена и опосредованно влияющую на его транскрипционную активность [3, 4].

МикроРНК относятся к классу коротких некодирующих РНК, регулирующих транскрипционную активность генов. Они инициируют разрушение матричной РНК, а также ингибируют ее трансляцию в белковую молекулу. Эти некодирующие РНК на молекулярном уровне вносят существенный вклад в онкогенез, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает их потенциальными биомаркерами злокачественных новообразований [5].

Создание надежных малоинвазивных методов диагностики аденокарциномы эндометрия и миомы невозможно без исследования показателя числа копий генов и уровней транскриптов микроРНК в плазме крови. Данные показатели сохраняют молекулярную стабильность во внеклеточных средах организма человека, в том числе в плазме крови [3, 4, 6].

В последние годы внимание исследователей привлекает показатель копийности митохондриальных локусов *HV2* и *MT-ND1* в качестве малоинвазивных маркеров различных онкологических заболеваний, в том числе рака почки [7], желудка [8], легкого [9], кишечника [10] и шейки матки [11]. Эти маркеры в плазме крови при аденокарциноме эндометрия и миоме в сочетании с таргетными микроРНК ранее не исследовались.

Цель исследования — выявление молекулярных малоинвазивных дифференциальных маркеров аденокарциномы эндометрия и миомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 26 пациенток с аденокарциномой эндометрия (G_{2-3}) и 14 пациенток с миомой, получавших в январе — мае 2024 г. лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (г. Ростов-на-Дону), а также 20 условно здоровых женщин (без злокачественных и доброкачественных образований и хронических заболеваний в стадии обострения). Средний возраст больных аденокарциномой эндометрия составил $62,0 \pm 1,9$ года, больных миомой — $51,7 \pm 2,5$ года, условно здоровых женщин — $58,5 \pm 4,3$ года. Средний возраст наступления менопаузы у пациенток всех групп — 50–55 лет.

По результатам послеоперационных исследований у пациенток с аденокарциномой матки был опухолевый процесс T1a–1b стадии; во всех случаях отсутствовали метастазы и лимфатические узлы не были вовлечены в патологический процесс. Неоадьювантного лечения больным не проводили.

Ожирение (индекс массы тела >30) встречалось у 69,2 % больных аденокарциномой эндометрия, у 21,4 % больных миомой и у 26,7 % условно здоровых женщин. Дисфункция щитовидной железы отмечалась в анамнезе только у пациенток с аденокарциномой (23,1 % случаев).

Для выделения плазмы кровь, полученную от пациенток на этапе госпитализации, центрифугировали при 2000 об/мин, 10 °C в течение 25 мин. Из нее выделяли внеклеточную ДНК (внДНК) фенол-хлороформным методом в модификации Д.С. Кутилина и Д.И. Водолажского [12]. Плазму в соотношении 1:1 смешивали с лизирующим раствором (2 % SDS, 1 % меркаптоэтанол), добавляли протеиназу К и инкубировали 30 мин при 58 °C. Далее вносили 2 мл смеси щелочного фенола и 2 мл хлороформа, перемешивали; инкубировали 10 мин при 20 °C, затем центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин и 10 °C. Смесь разделялась на 2 фазы: фенол-хлороформную и водную, содержащую ДНК. Водную фазу переносили в отдельную пробирку,

добавляли равный объем 96 % изопропилового спирта и хлорида натрия до концентрации в растворе 100 мМ. После 60-минутной инкубации при температуре не выше –20 °C осуществляли 15-минутное центрифугирование при 12 000 об/мин и –4 °C. Получившийся осадок промывали 80 % этиловым спиртом, который элиминировали путем центрифугирования и термостатирования при 58 °C. Осадок, свободный от этанола, растворяли в ТЕ-буфере.

Относительную копию генетических локусов определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Перечень праймеров представлен в табл. 1. Последовательности синтетических олигонуклеотидов сконструированы с использованием алгоритма Primer-BLAST и базы данных NCBI GenBank. *GAPDH* и *B2M* использовали в качестве референсных локусов для нормализации данных ПЦР в реальном времени.

Реакцию амплификации проводили на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США) в 20 мкл ПЦР-смеси (внДНК ($\geq 0,5$ нг); 0,2 мМ dNTP; 0,4 мкМ праймеров; 2,5 мМ $MgCl_2$; 1х ПЦР-буфер с интеркалирующим красителем EvaGreen и 0,1 е.а./мкл SynTaq ДНК-полимеразы) по следующей программе: 95 °C 3 мин, 40 циклов — 95 °C 10 с, 55 °C 30 с (чтение оптического сигнала по каналу FAM) и 72 °C 20 с. Относительную копию (rC) рассчитывали по формуле: $rC = E^{-\Delta\Delta Ct}$.

Поиск микроРНК, взаимодействующих с генами-регуляторами, осуществляли с использованием модифицированного алгоритма машинного обучения Random forest для прогнозирования сайта-мишени микроРНК. Алгоритм сочетает 2 подхода: методы бэггинга и случайных подмножеств. Результатом выполнения алгоритма служит прогноз вероятности того, что искомым сайт-кандидат является истинным целевым сайтом связывания [13].

Для выделения микроРНК из образцов плазмы крови на автоматической станции Qiascube Connect (Qiagen, Германия) использовали набор miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия). МикроРНК и малую РНК U6 выявляли методом, предложенным I. Balcells и соавт. [14]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной транскрипции

Таблица 1. Праймеры для определения относительной копии генов

Table 1. Primers for determining the relative copy number of genes

Ген Gene	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer
<i>GAPDH</i>	GCTGAACGGAAGCTCACT	GCAGGTTTCTAGACGGCAG
<i>B2M</i>	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
<i>HV2</i>	GGGAGCTCTCCATGCATTTGGTA	AAATAATAGGATGAGGCAGGAATC
<i>MT-ND1</i>	TACAACCTACGCAAAGGCCCC	TGGTAGATGTGGCGGGTTTTT

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов для определения уровней транскриптов микроРНК

Table 2. Oligonucleotide sequences for determining the levels of microRNA transcripts

МикроРНК MicroRNA	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer	RT-праймер RT-primer
hsa-miR-143-5p	TGCAGTGTCTGCATCTCT	GGTCCAGT(15)ACCA	CAGGTCCAGT(15)AC
hsa-miR-122-5p	GCAGTGGAGTGTGACAATG	CCAGT(15)CAAACACC	CAGGTCCAGT(15)CA
hsa-miR-7106-5p	TGGGAGGAGGGGATCT	TCCAGT (15)CCCAA	CAGGTCCAGT(15)CC

с RT-праймерами и одновременным полиаденилированием. Детекцию полученной комплементарной ДНК осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Разработку олигонуклеотидных праймеров также проводили по алгоритму, описанному I. Balcells и соавт. [14] (табл. 2).

В реакции обратной транскрипции использовали смесь, содержащую 1x поли(А)-буфер; 10 ед. акт./мкл MMLV обратной транскриптазы; 0,1 мМ dNTPs; 0,1 мМ аденозинтрифосфорной кислоты; 1 мкМ RT-праймера; 0,5 ед. акт./мкл Poly(А)-полимеразы и 500 нг тотальной РНК. Реакцию проводили по следующему протоколу: инкубировали 15 мин при 16 °С, 15 мин при 42 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали инкубацией при 95 °С в течение 2 мин.

Относительную экспрессию микроРНК определяли методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили в 20 мкл ПЦР-смеси: 1x ПЦР-буфер; 0,25 мМ dNTPs; 2 мМ MgCl₂; 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 490 нМ прямого и обратного праймеров. Смесь инкубировали в термоциклере CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей схеме: 3 мин 94 °С, 50 циклов: денатурация – 95 °С 10 с, отжиг и элонгация – 64 °С 20 с.

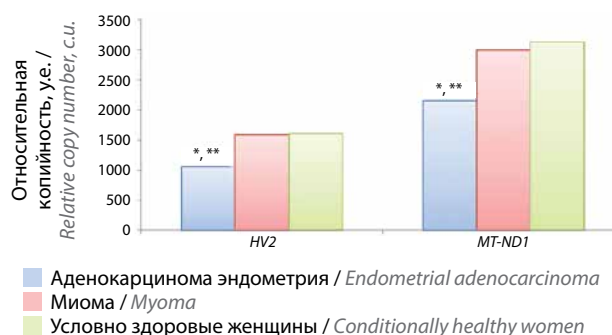
Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения показателей оценивали с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для оценки различий использовали критерий Манна–Уитни и поправку Бонферрони на множественное сравнение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ копийности митохондриальных локусов *HV2* и *MT-ND1* во внеклеточной ДНК плазмы крови 26 пациенток с аденокарциномой эндометрия, 14 пациенток с миомой матки и 20 условно здоровых женщин продемонстрировал статистически значимые различия в этих показателях ($p < 0,05$). В плазме крови больных аденокарциномой эндометрия копийность *HV2* и *MT-ND1* была ниже в 1,5 ($p < 0,005$) и 1,4 ($p < 0,05$) раза соответственно значения этого показателя у больных миомой и в 1,5 раза ниже значения этого параметра у условно здоровых женщин. Между пациентками с миомой и условно здоровыми женщинами статистически значимых различий по уровню копийности генов не обнаружено (рис. 1 и 2).

С использованием модифицированного биоинформатического алгоритма машинного обучения Random forest предсказаны 74 молекулы микроРНК, способные взаимодействовать с матричной РНК локусов *HV2* и *MT-ND1*. Из них 18 микроРНК валидированы в базе miRDB. Три микроРНК – hsa-miR-143-5p, hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p – одновременно образовывали наиболее прочные комплексы с соответствующими участками матричной РНК генов-мишеней *HV2* и *MT-ND1* (рис. 3). Уровень этих микроРНК экспериментально проверен на образцах плазмы крови больных аденокарциномой эндометрия и миомой.

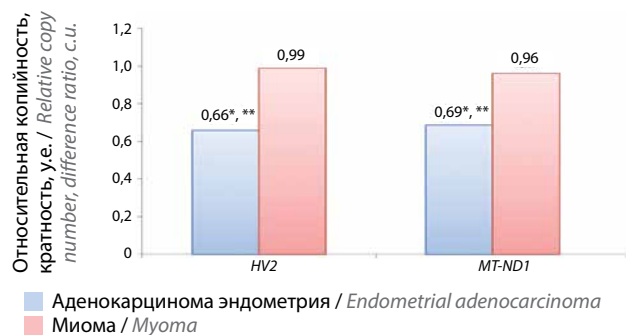
В плазме крови больных аденокарциномой эндометрия уровни транскриптов микроРНК hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p были ниже в 8,9 ($p < 0,005$) и 3,9 ($p < 0,005$) раза соответственно относительно их уровней у больных миомой. В плазме крови больных аденокарциномой эндометрия уровни транскриптов микроРНК hsa-miR-143-5p, hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p оказались меньше в 2,1 ($p < 0,005$), 10,8 ($p < 0,005$) и 5,2 ($p < 0,005$) раза соответственно относительно их уровней у условно здоровых женщин (рис. 4).



*Статистически значимые различия показателей копийности между больными аденокарциномой и миомой ($p < 0,05$). **Статистически значимые различия показателей копийности между больными аденокарциномой и условно здоровыми женщинами ($p < 0,05$) / *Statistically significant differences in copy rates between patients with adenocarcinoma and fibroids ($p < 0.05$). **Statistically significant differences in copy rates between patients with adenocarcinoma and conditionally healthy women ($p < 0.05$)

Рис. 1. Особенности копийности митохондриальных локусов во внеклеточной ДНК плазмы крови пациенток с аденокарциномой эндометрия, миомой матки и условно здоровых женщин относительно референсных локусов (генов ядра)

Fig. 1. Features of mitochondrial loci replication in extracellular plasma DNA of patients with endometrial adenocarcinoma, uterine fibroids, and conditionally healthy women relative to reference loci (nuclear genes)



*Статистически значимые различия показателей копияности между больными аденокарциномой и миомой ($p < 0,05$). **Статистически значимые различия показателей копияности между больными аденокарциномой и условно здоровыми женщинами ($p < 0,05$) / *Statistically significant differences in copy rates between patients with adenocarcinoma and fibroids ($p < 0.05$). **Statistically significant differences in copy rates between patients with adenocarcinoma and conditionally healthy women ($p < 0.05$)

Рис. 2. Копийность митохондриальных генов в плазме крови пациенток с аденокарциномой эндометрия и миомой относительно этого показателя у условно здоровых женщин

Fig. 2. The copy number of mitochondrial genes in the blood plasma of patients with endometrial adenocarcinoma and fibroids relative to this indicator in conditionally healthy women

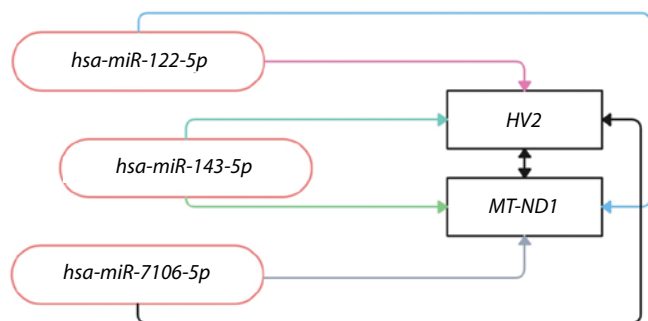


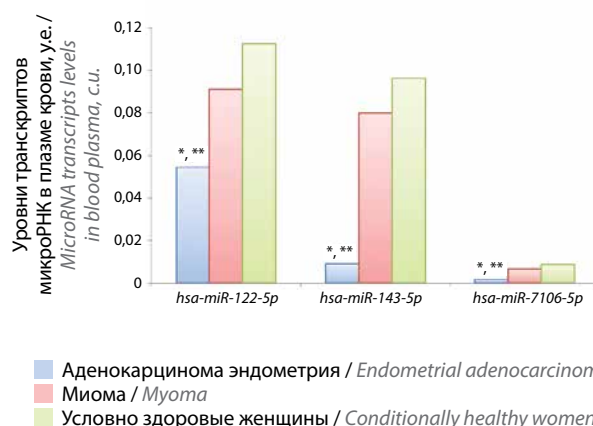
Рис. 3. МикроРНК, одновременно взаимодействующие с матричными РНК HV2 и MT-ND1

Fig. 3. MicroRNAs simultaneously interacting with HV2 and MTND1 messenger RNAs

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования мы обнаружили изменение уровней копияности митохондриальных генов *HV2* и *MT-ND1* и транскриптов микроРНК *hsa-miR-143-5p*, *hsa-miR-122-5p* и *hsa-miR-7106-5p* в плазме крови больных аденокарциномой эндометрия.

HV2 — гипервариабельный участок D-петли митохондриальной ДНК (с 33-го по 160-й нуклеотид) — относится к некодирующим элементам с высокой частотой мутаций. По изменению копияности локуса *HV2* можно оценить флуктуации числа копий митохондриальной ДНК, а также судить о состоянии окислительного фосфорилирования клеток [15]. Мутации в этой области наблюдаются при различных онкологических



*Статистически значимые различия уровней транскриптов между больными аденокарциномой и миомой ($p < 0,005$). **Статистически значимые различия транскриптов между больными аденокарциномой и условно здоровыми женщинами ($p < 0,005$) / *Statistically significant differences in transcript levels between patients with adenocarcinoma and fibroids ($p < 0.005$). **Statistically significant differences in transcripts between adenocarcinoma patients and conditionally healthy women ($p < 0.005$)

Рис. 4. Уровень транскриптов микроРНК в плазме крови пациенток с аденокарциномой эндометрия, миомой и условно здоровых женщин

Fig. 4. The level of microRNA transcripts in the blood plasma of patients with endometrial adenocarcinoma, fibroids, and conditionally healthy women

заболеваниях, в том числе при раке почки [7]. Копийность *HV2* оценивали многие исследователи при различных злокачественных опухолях. Так, по данным одних авторов, у больных раком желудка разных стадий и условно здоровых доноров крови не выявлено значимой ассоциации копияности этого локуса в плазме с риском развития заболевания, но обнаружена корреляция данного показателя с прогрессией рака желудка [16]. Другие исследователи показали связь копияности локуса *HV2* с риском малигнизации тканей желудка [8]. В ходе исследования, выполненного в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований на базе Ростовского научно-исследовательского онкологического института (г. Ростов-на-Дону), у большинства больных раком легкого выявлено значимое снижение числа копий *HV2* во вДНК по сравнению с условно здоровыми донорами крови [9].

MT-ND1 — митохондриальный ген, кодирующий NADH-убихинон оксидоредуктазу (ND1). Белок ND1 — субъединица NADH-дегидрогеназы, являющейся одним из 5 комплексов цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий [17]. Этот белок принадлежит к минимальному набору, необходимому для катализа дегидрирования NADH и переноса электронов на убихинон (кофермент Q10). Дисфункция митохондрий, вызванная вариантами *MT-ND1*, связана с метаболическими нарушениями, включая ожирение, диабет и гипертонию [18].

При развитии рака обнаружено нарушение регуляции *MT-ND1*. Наличие циркулирующего *MT-ND1* во внДНК коррелировало с прогрессированием опухоли и прогнозом ответа на химиотерапию. Концентрация и варианты циркулирующего *MT-ND1* имеют потенциал для диагностики и мониторинга колоректального рака [10]. При большинстве видов рака в образцах опухолевых тканей экспрессия *MT-ND1* снижена по сравнению с нормальными тканями. В 81 % случаев рака желудка обнаружены изменения митохондриальной ДНК, которые в основном локализовались в *MT-ND1* и D-петле (*HV2*). При раке поджелудочной железы в *MT-ND1* выявлены специфические мутации G3421A (V39I), A3505G (T67A), G3670A (A122T) и C3564T. Обнаружено, что при аденокарциноме поджелудочной железы число копий *MT-ND1* в плазме находится на более высоком уровне. У больных раком шейки матки выявлены более низкие экспрессия матричной РНК *MT-ND1* и его копийность [11].

Митохондриальные гены *HV2* и *MT-ND1* являются мишенями микроРНК hsa-miR-143-5p, hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p. MiR-122 участвует в широком спектре клеточных процессов и взаимодействует со многими молекулами. Ядерный фактор гепатоцитов 4A (HNF4A) представляет собой фактор транскрипции, который, как было показано, контролируется miR-122 посредством нацеливания на индуцирующую транскрипционный ядерный фактор κВ киназу (NF-κB) (NIK). Приведены доказательства того, что инфицирование вирусом гепатита С вызывает снижение уровня miR-122. M. Faramin Lashkarian и соавт. рассмотрели биологическую роль miR-122-5p при раке желудка. В тканях и клетках опухолей желудка авторы выявили низкую экспрессию miR-122-5p. Результаты объединенного исследования 3 наборов данных GEO и клинических образцов показали, что в тканях пациентов с колоректальным раком, наоборот, наблюдалась сверхэкспрессия miR-122. У больных колоректальным раком также выявлена повышенная экспрессия экзосомальной miR-122 в крови [19]. Активность miR-122 в клетках рака яичников исследована Y. Duan и соавт., которые впервые показали, что hsa-miR-122 ингибирует сигнальные пути, ответственные за подвижность клеток опухолей яичников, их инвазию и метастазирование в брюшной полости путем воздействия на субъединицу P4HA1. Это свидетельствует о том, что данную микроРНК можно рассматривать в качестве терапевтической мишени при раке яичников [20]. Y. Yang и соавт. также предприняли попытку определить прогностическое

значение miR-122 при раке шейки матки. Результаты их исследования показали, что miR-122, напрямую воздействующая на *RAD21*, подавляет пролиферацию и миграцию клеток, вызывая апоптоз при этой патологии. Кроме того, было подтверждено, что miR-122 может служить прогностическим биомаркером для пациенток с раком шейки матки, а более высокие уровни экспрессии miR-122 у пациенток с данным заболеванием связаны с лучшим прогнозом [21].

В работе Н. Xiong и соавт. показана роль hsa-miR-7106-5p в развитии рака молочной железы [22]. Данных об участии hsa-miR-7106-5p в возникновении или прогрессировании других онкологических заболеваний нет.

Обнаруженные нами изменения копийности генов *HV2* и *MT-ND1* теоретически могут отражать их уровень в тканях, увеличение копийности в которых должно положительно коррелировать с экспрессией этих генов. Соответственно, в тканях аденокарциномы эндометрия будут наблюдаться снижение экспрессии генов *HV2* и *MT-ND1* и, основываясь на общеизвестных принципах молекулярной биологии, увеличение уровней таргетирующих этих локусов микроРНК. Поэтому выявленное снижение уровней транскриптов микроРНК hsa-miR-143-5p, hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p в плазме крови, скорее всего, не отражает их уровень в тканях эндометрия. В этом направлении требуются дополнительные исследования.

Таким образом, полученные нами данные согласуются с известными в мировом научном сообществе представлениями о роли *HV2*, *MT-ND1*, hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p. При этом они раскрывают некоторые особенности регуляции митохондриальных локусов при раке эндометрия и миоме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлены дифференциальные различия в копийности *HV2* и *MT-ND1* в плазме крови больных аденокарциномой эндометрия и миомой, а также в уровнях транскриптов микроРНК hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p, регулирующих эти локусы, в плазме крови пациенток с аденокарциномой эндометрия и миомой. Полученные данные закладывают основу для дальнейших исследований показателей копийности *HV2* и *MT-ND1*, уровней транскриптов hsa-miR-122-5p и hsa-miR-7106-5p в качестве потенциальных маркеров для малоинвазивной дифференциальной диагностики аденокарциномы эндометрия и миомы на увеличенных выборках пациентов и здоровых доноров.

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

- Кутилин Д.С., Никитин И.С., Кит О.И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. *Успехи молекулярной онкологии* 2019;6(1):57–62. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62
Kutulin D.S., Nikitin I.S., Kit O.I. Features of some transcription factors gene expression in the malignancy tissues of the corpus uteri. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(1):57–62. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62
- World Cancer Report 2014. World Health Organization. Chapter 5.12. Causes, risk factors, and prevention TOPICS - Do we know what causes endometrial cancer? American Cancer Society. Retrieved 5 January 2015.
- Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки. *Российский биотерапевтический журнал* 2022;21(4):41–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49
Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. The level of replication of genetic loci and minimally invasive assessment of the effectiveness of radiation therapy in patients with rectal cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(4):41–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49
- Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кит О.И., Кутилин Д.С. Малоинвазивная молекулярная диагностика серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности. *Онкогинекология* 2021;4(40):35–49. DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35
Tsandekova M.R., Porkhanova N.V., Kit O.I., Kutulin D.S. Minimally invasive molecular diagnostics of high and low grade ovarian serous adenocarcinoma. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2021;4(40):35–49. (In Russ.). DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35
- Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Нарушения в регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и радиорезистентность опухолей прямой кишки. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2021;11:12–29. DOI: 10.17513/mjpf.13306
Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Disorders in the regulatory network of competitively interacting RNAs and radioresistance of rectal tumors. *Mezhdunarodny zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research* 2021;11:12–29. (In Russ.). DOI: 10.17513/mjpf.13306
- Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А. и др. Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой легкого. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2019;167(6):731–8. DOI: 10.23683/0321-3005-2017-3-2-74-82
Kutulin D.S., Ayrapetova T.G., Anistratov P.A. et al. Changes in gene copy in tumor cells and extracellular DNA in patients with lung adenocarcinoma. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2019;167(6):731–8. (In Russ.). DOI: 10.23683/0321-3005-2017-3-2-74-82
- Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С. и др. Копийность генов *GSTP1*, *NFKB1* и локуса HV2 митохондриальной ДНК при некоторых гистологических типах рака желудка. *Успехи современного естествознания* 2015;1–6:918–21.
Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutulin D.S. et al. The copyicity of the *GSTP1*, *NFKB1*, and HV2 mitochondrial DNA genes in some histological types of gastric cancer. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Successes of Modern Natural Science* 2015;1–6:918–21. (In Russ.).
- Fernfndes J., Michel V., Camoalinga-Ponce V. et al. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(11):2430–8. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0471
- Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А. и др. Изменение относительной копийности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки* 2017;3:74–83. DOI: 10.23683/0321-3005-2017-3-2-74-82
Kutulin D.S., Ayrapetova T.G., Anistratov P.A. et al. Changes in the relative copy number of genetic loci in extracellular DNA in patients with lung adenocarcinoma. *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennye nauki = Izvestiya Universities. The North Caucasus Region. Natural Sciences* 2017;3:74–83. (In Russ.). DOI: 10.23683/0321-3005-2017-3-2-74-82
- Xu Y., Zhou J., Yuan Q. et al. Quantitative detection of circulating MT-ND1 as a potential biomarker for colorectal cancer. *Bosn J Basic Med Sci* 2021;21(5):577–86. DOI: 10.17305/bjbm.2021.5576
- Xu Y.C., Su J., Zhou J.J. et al. Roles of MT-ND1 in cancer. *Curr Med Sci* 2023;43(5):869–78. DOI: 10.1007/s11596-023-2771-0
- Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Гудуева Е.Н. Изменение копийности генетических локусов при раке желудка. *Молекулярная биология* 2015;49(4):658–68. DOI: 10.7868/S0026898415040096
Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutulin D.S., Gudueva E.N. Copy variation of genetic loci in gastric cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2015;49(4):658–68. (In Russ.). DOI: 10.7868/S0026898415040096
- Ding J., Li X., Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics* 2016;32(18):2768–75. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw318
- Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 2011;11(1):70. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70
- Scatena R. Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv Exp Med Biol* 2012;942:287–308. DOI: 10.1007/978-94-007-2869-1_13
- Liao L.M., Baccarelli A., Shu X.O. et al. Mitochondrial DNA copy number and risk of gastric cancer: a report from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(9):1944–9. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0379
- Voet D.J., Voet J.G., Pratt C.W. *Fundamentals of Biochemistry*. Chapter 18. Mitochondrial ATP synthesis. 4th edn. Hoboken, NJ: Wiley, 213. Pp. 581–620.
- Flaquer A., Baumbach C., Kriebel J. et al. Mitochondrial genetic variants identified to be associated with BMI in adults. *PLoS One* 2014;9(8):e105116. DOI: 10.1371/journal.pone.0105116
- Faramin Lashkarian M., Hashemipour N., Niaraki N. et al. MicroRNA-122 in human cancers: from mechanistic to clinical perspectives. *Cancer Cell Int* 2023;23:29. DOI: 10.1186/s12935-023-02868-z
- Duan Y., Dong Y., Dang R. et al. MiR-122 inhibits epithelial mesenchymal transition by regulating P4HA1 in ovarian cancer cells. *Cell Biol Int* 2018;42(11):1564–74. DOI: 10.1002/cbin.11052
- Yang Y., Liu Y., Liu W. et al. MiR-122 inhibits the cervical cancer development by targeting the oncogene RAD21. *Biochem Genet* 2022;60(1):303–14. DOI: 10.1007/s10528-021-10098-z
- Xiong H., Chen Z., Chen W. et al. FKBP-related ncRNA-mRNA axis in breast cancer. *Genomics* 2020;112(6):4595–607. DOI: 10.21203/rs.3.rs-16732/v1

Вклад авторов

О.И. Кит, Е.М. Франциянц: идея, разработка методологии и дизайна исследования;
И.В. Каплиева: написание текста статьи, анализ и интерпретация данных;
Д.С. Кутилин: выполнение полимеразной цепной реакции, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
И.В. Нескубина: обзор литературы по теме статьи, научное редактирование;
В.А. Бандовкина: анализ полученных данных, редактирование;
Л.К. Трепитаки: сбор и обработка данных, подготовка иллюстраций;
Е.И. Сурикова: сбор, анализ и интерпретация данных.

Authors' contributions

O.I. Kit, E.M. Frantziants: idea, development of methodology and design of research;
I.V. Kaplieva: article writing, analysis and interpretation of data;
D.S. Kutilin: performing polymerase chain reaction, data analysis and interpretation, article writing;
I.V. Neskubina: literature review on the topic of the article, scientific editing;
V.A. Bandovkina: analysis of the received data, editing;
L.K. Trepitaki: data collection and processing, preparation of illustrations;
E.I. Surikova: data collection, analysis and interpretation.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>
Е.М. Франциянц / E.M. Frantsiyants: <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>
И.В. Каплиева / I.V. Kaplieva: <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>
Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>
И.В. Нескубина / I.V. Neskubina: <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>
В.А. Бандовкина / V.A. Bandovkina: <https://orcid.org/0000-0002-2302-8271>
Л.К. Трепитаки / L.K. Trepitaki: <https://orcid.org/0000-0002-9749-2747>
Е.И. Сурикова / E.I. Surikova: <https://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. Исследование выполнено с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742>).

Funding. This research was conducted without sponsorship. The study was performed using the scientific equipment of the Center for Collective Use of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742>).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен советом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 22 от 05.09.2023).

Все женщины, участвовавшие в исследовании, подписали добровольное информированное согласие на медицинское вмешательство и использование биологического материала в научных целях.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 22 dated 05.09.2023).

All the women participating in the study signed a voluntary informed consent for medical intervention and the use of biological material for scientific purposes.

Статья поступила: 07.08.2024. **Принята к публикации:** 21.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 07.08.2024. **Accepted for publication:** 21.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-84-95>

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, идентифицированных в ходе секвенирования нового поколения, с раком шейки матки

К.В. Ленкова¹, Р.М. Минязева², В.Л. Ахметова^{1,3}, И.Р. Гилязова^{1,2}, Р.И. Хусаинова^{1,4}, И.Р. Миннихметов⁴

¹Институт биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»; Россия, 450054 Уфа, пр-кт Октября, 71;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 450008 Уфа, ул. Ленина, 3;

³ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий»; Россия, 450008 Уфа, ул. Карла Маркса, 12;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России; Россия, 117292 Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11

Контакты: Ксения Вячеславовна Ленкова ms.kv.kl@mail.ru

Введение. Рак шейки матки по распространенности занимает 4-е место среди злокачественных новообразований у женщин в мире, и заболеваемость им неуклонно растет. Предполагается, что формирование ассоциированного с вирусом папилломы человека рака шейки матки зависит от генетических и эпигенетических факторов, однако молекулярный патогенез данной патологии еще не установлен. Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что герминальные замены не только увеличивают риск развития рака, но и влияют на прогрессирование опухоли и формируют картину соматических изменений при злокачественном новообразовании.

Цель исследования – поиск герминальных вариантов генов *MTHFR*, *MET* и *CHEK2* и оценка их значимости в формировании генетической предрасположенности к раку шейки матки.

Материалы и методы. Проанализирована ДНК 108 женщин с раком шейки матки. В группу сравнения вошла 51 пациентка с элиминацией вируса папилломы человека и 333 условно здоровых женщины. В когорте больных проведено исследование с использованием методов секвенирования нового поколения (next generation sequencing NGS) и разработанной нами кастомной панели, нацеленной на гены, участвующие в опухолеобразовании. Также проанализирована клиническая значимость выявленных замен на основе данных литературы, баз данных и с помощью биоинформатических методов. Для вариантов с.677С>Т и с.1298А>С гена *MTHFR*, с.2962С>Т гена *MET*, с.972G>С гена *CHEK2* проведены дополнительные ассоциативные исследования.

Результаты. Выявлено, что полиморфные варианты с.972G>С и с.1312С>А гена *CHEK2* обладают патогенным потенциалом. Из 11 обнаруженных в результате исследования замен в гене *MET* варианты с.2962С>Т, с.2975С>Т и с.3895G>С являются вероятно патогенными. Выявлена ассоциация аллеля Т локуса с.2962С>Т гена *MET* ($p = 0,002$; $\chi^2 = 9,8$) и аллеля С локуса с.972G>С гена *CHEK2* ($p = 0,05$; $\chi^2 = 3,8$) с риском развития рака шейки матки.

Заключение. В ходе исследования выявлена группа герминальных замен в генах *MTHFR*, *MET* и *CHEK2* с неясным клиническим значением. Определено, что патогенный потенциал в отношении формирования рака шейки матки имеют замены с.972G>С и с.1312С>А гена *CHEK2* и с.2962С>Т, с.2975С>Т, с.3895G>С гена *MET*. Также выявлены ранее не описанные ассоциации локусов с.2962С>Т гена *MET* и с.972G>С гена *CHEK2* с данной патологией.

Ключевые слова: рак шейки матки, генетическая предрасположенность, онкогенетика, секвенирование нового поколения, вирус папилломы человека, *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*

Для цитирования: Ленкова К.В., Минязева Р.М., Ахметова В.Л. и др. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, идентифицированных в ходе секвенирования нового поколения с раком шейки матки. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):84–95.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-84-95>

Search for associations of polymorphic variants of the *MTHFR*, *MET*, *CHEK2* genes, identified through next-generation sequencing, with cervical cancer

K.V. Lenkova¹, R.M. Minyazeva², V.L. Akhmetova^{1,3}, I.R. Gilyazova^{1,2}, R.I. Khusainova^{1,4}, I.R. Minniakhmetov⁴

¹ Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences; 71 Oktyabrya Prospekt, Ufa 450054, Russia;

² Bashkir State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Lenina St., Ufa 450008, Russia;

³ Ufa University of Science and Technology; 12 Karl Marks St., Ufa 450008, Russia;

⁴ National Medical Research Center of Endocrinology, Ministry of Health of Russia; 11 Dmitriya Ulyanova St., 117292 Moscow, Russia

Contacts: Kseniya Vyacheslavovna Lenkova ms.kv.kl@mail.ru

Introduction. Worldwide, cervical cancer is the 4th most common cancer in women, and morbidity continues to grow. Supposedly, development of human papilloma virus-associated cervical cancer depends on genetic and epigenetic factors, but molecular pathogenesis of this pathology has not yet been established. Recently obtained data show that germline substitutions not only increase the risk of cancer but also affect tumor progression and form the picture of somatic changes in this malignant neoplasm.

Aim. To investigate germline variants of the *MTHFR*, *MET* and *CHEK2* genes and evaluate their significance in development of genetic predisposition towards cervical cancer.

Materials and methods. DNA of 108 women with cervical cancer was analyzed. The comparison group included 51 patients with human papilloma virus elimination and 333 relatively healthy women. In the patient cohort, an analysis was performed using next-generation sequencing (NGS) and a custom panel aimed at genes participating in tumor designed by us. Additionally, clinical significance of the identified substitutions was evaluated using literature data, databases and bioinformatics methods. Additional association studies were performed for c.677C>T and c.1298A>C variants of the *MTHFR* gene, c.2962C>T variant of the *MET* gene, c.972G>C variant of the *CHEK2* gene.

Results. It was observed that polymorphic variants c.972G>C and c.1312C>A of the *CHEK2* gene have pathogenic potential. Among 11 substitutions in the *MET* gene identified during the study, variants c.2962C>T, c.2975C>T and c.3895G>C are liable to be pathogenic. Correlations between T locus allele c.2962C>T of the *MET* gene ($p = 0.002$; $\chi^2 = 9.8$) and C locus allele c.972G>C of the *CHEK2* gene ($p = 0.05$; $\chi^2 = 3.8$) with the risk of cervical cancer development were found.

Conclusion. During the study, a group of germline substitutions in the *MTHFR*, *MET* and *CHEK2* genes with unclear clinical significance was identified. It was shown that substitutions c.972G>C and c.1312C>A in the *CHEK2* gene and c.2962C>T, c.2975C>T, c.3895G>C in the *MET* gene have pathogenic potential in the context of cervical cancer. Additionally, previously unknown associations between loci c.2962C>T of the *MET* gene and c.972G>C of the *CHEK2* gene with this pathology were described.

Keywords: cervical cancer, genetic predisposition, oncogenetics, next-generation sequencing, human papilloma virus, *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*

For citation: Lenkova K.V., Minyazeva R.M., Akhmetova V.L. et al. Search for associations of polymorphic variants of the *MTHFR*, *MET*, *CHEK2* genes, identified through next-generation sequencing, with cervical cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):84–95. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-84-95>

ВВЕДЕНИЕ

Рак шейки матки (РШМ) по распространенности занимает 4-е место в структуре онкологических заболеваний у женщин. В 2022 г. данная патология диагностирована у 660 тыс. женщин, около 350 тыс. пациенток умерли от этого заболевания [1]. По прогнозам, без своевременного вмешательства смертность от РШМ к 2030 г. увеличится на 88 %, что подчеркивает острую необходимость принятия профилактических мер [2].

Основным этиологическим агентом развития РШМ является вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска [3]. В 90 % случаев ВПЧ-инфекция регрессирует спонтанно в течение 2 лет [4]. Предполагается, что формирование ВПЧ-ассоциированного РШМ зависит от генетических и эпигенетических факторов, однако молекулярный патогенез заболевания еще не установлен [5].

Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что герминальные замены не только увеличивают риск развития рака, но и влияют на прогрессирование опухоли и формируют картину соматических изменений при злокачественных новообразованиях [6, 7]. Полиморфные варианты гена *MTHFR*, включая C677T (rs1801133) и A1298C (rs1801131), приводят к снижению активности фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, который играет решающую роль в метаболическом пути фолата, синтезе и метилировании ДНК [8]. Результаты метаанализа К. Yi и соавт. показали, что вариант C677T гена *MTHFR* не ассоциирован с риском развития РШМ, но полиморфизм A1298C гена *MTHFR* может быть связан с ним [9]. Данные, полученные в ходе более позднего метаанализа, позволяют предположить, что варианты C677T и A1298C гена *MTHFR* коррелируют с риском

возникновения распространенных гинекологических раковых заболеваний, в том числе РШМ [10].

Патогенные герминальные мутации в гене *CHEK2* входят в число наиболее частых изменений при различных опухолях. Их ассоциация с высоким риском развития злокачественных новообразований подтверждена для таких гендерно-специфичных опухолей, как рак молочной и предстательной желез [11]. *MET* является протоонкогеном, который контролирует развитие, пролиферацию, инвазию, метастазирование, ангиогенез, хеморезистентность, эпителиально-мезенхимальный переход и формирование опухолевого микроокружения раковых клеток. Его успешно используют в качестве биомаркера для диагностики, определения прогноза выживаемости, риска возникновения рецидива после хирургического вмешательства, а также в качестве терапевтической молекулярной мишени [12].

Цель исследования — поиск герминальных замен в генах *MTHFR*, *MET* и *CHEK2* и оценка их значимости в формировании генетической предрасположенности к РШМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборки. Проанализирована ДНК 108 женщин с РШМ, не состоящих в кровном родстве и проживающих в Республике Башкортостан. Обследование, окончательное установление диагноза и лечение пациенток проводились на базе ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан (г. Уфа). Медиана возраста пациенток составила 50 лет. ВПЧ-статус по умолчанию считался положительным. Все больные получали лечение согласно актуальным клиническим рекомендациям. У 89,11 % женщин исследуемой выборки была плоскоклеточная карцинома, у 7,92 % — аденокарцинома, у 2,97 % — опухоли других гистологических типов. В исследуемую группу вошли представители 3 наиболее распространенных на территории Республики Башкортостан этнических групп: русские, татары и башкиры.

В качестве группы сравнения для изучения полиморфных локусов гена *MTHFR* использована ДНК 51 женщины с элиминацией ВПЧ (носительство вируса у них не привело к его персистенции и развитию РШМ). Факт вирусоносительства установлен в рамках пилотного проекта по скринингу ВПЧ высокого канцерогенного риска [13]. В дальнейшем больные находились под наблюдением гинеколога по месту прикрепления до спонтанной элиминации ВПЧ. В течение всего периода наблюдения результаты цитологического исследования шейки матки (NILM) пациенток были хорошими, что указывает на отсутствие патологических изменений цервикального эпителия.

В группу сравнения для изучения однонуклеотидных замен в генах *MET* и *CHEK2* вошли 51 женщина с элиминацией ВПЧ и 333 условно здоровых женщины.

Выделение ДНК. Геномная ДНК выделена из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-

хлороформной экстракции по Mathew. Количество и чистоту полученной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Invitrogen; Thermo FisherScientific, Сингапур), флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen, Thermo FisherScientific, Сингапур) и электрофореза на 1,5 % агарозном геле.

Секвенирование нового поколения и полимеразная цепная реакция. Исследование выборки женщин с РШМ проведено с использованием разработанной нами кастомной панели секвенирования нового поколения (next generation sequencing NGS), состоящей из 48 генов, которая содержит гены *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*. Подготовка библиотек образцов для проведения NGS-анализа выполнена с помощью набора реагентов KAPA Hyper Cap Workflow v 3.0 (Roshe Diagnostics, Германия). Все этапы пробоподготовки мультиплексных, гибридизированных, обогащенных библиотек проведены в соответствии с инструкцией производителя. NGS выполнено с помощью секвенатора нового поколения MiSeq Series (Illumina, США) и набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) (Illumina, США). Анализ клинической значимости найденных замен с неопределенной значимостью проводили с использованием баз данных ClinVar и предсказательных программ SIFT, PolyPhen, MetaLR, CADD и MutationAssessor. Сведения о распространенности замен взяты из базы данных GnomAD с учетом рекомендаций Американского колледжа медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) [14–16]. Если данные были противоречивыми, мы проводили предсказательный функциональный анализ белковых продуктов, который осуществляли с помощью ресурсов для построения пространственной модели белка (SWISS-MODEL), определения изменений в нем (DynaMut2) и анализа структуры и функций доменов и регионов, на которые пришелся эффект замены основания (UniProt, AlphaFold). Веб-сервер DynaMut2 точно предсказывает эффект мутаций в контексте трехмерной структуры белка и позволяет выявить молекулярные последствия одиночных мутаций для сворачивания, стабильности и динамики белка на основании прогнозирования изменений свободной энергии Гиббса ($\Delta\Delta G$) и температуры плавления (ΔT_m), т. е. в результате изменений вибрационной энтропии [17]. С помощью DynaMut2 мы определили предсказанное изменение стабильности (predicted stability change). Если оно было отрицательным, значит, замена аминокислоты приводит к снижению стабильности белка. Однако наряду со всеми данными важным критерием для оценки значимости замены была ее частота.

Анализ исследованных локусов в группе пациентов с РШМ и контрольных группах проведен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием технологии TaqMan. Локусы rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR* генотипированы с помощью набора реактивов компании «Синтол» (Россия) согласно инструкции производителя с применением детекти-

рующего амплификатора CFX96 (BioRad, США), локусы rs34589476 гена *MET* и rs1060502712 гена *CHEK2* — с помощью реактивов ООО «ДНК-Синтез» (Россия) согласно протоколу производителя с использованием системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени ДТ-прайм («ДНК-Технология», Россия).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали веб-ресурс Plink с набором инструментов для полногеномного анализа ассоциаций (<https://zzz.bwh.harvard.edu/plink/data.shtml>). Анализ проведен с помощью инструментов операционной системы Microsoft Windows, включая Excel и Notepad. Для определения статистической значимости различий между группами применяли χ^2 -критерий. Кроме того, были рассчитаны отношения шансов (ОШ).

Все анализы учитывали двусторонний уровень значимости. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Если при расчетах вдоль любой из диагоналей таблицы сопряженности присутствовали нули, то использовали также поправку Холдейна–Энскомба:

к значениям каждой ячейки соответствующей подтаблицы 2×2 перед расчетом ОШ добавляли 0,5 [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полиморфных вариантов в гене *MTHFR*.

В ходе NGS обнаружены относительно частые варианты генов *MTHFR*, *CHEK2* и *MET*. Мы изучили частоту их встречаемости в контрольных группах женщин, а также ассоциации исследованных локусов с РМШ.

Полиморфный вариант p.(Ala222Val) гена *MTHFR* (c.677C>T, rs1801133, chr1: 11856378) согласно базе данных Variant Interpreter (Illumina, США) является патогенным, а вариант p.(Glu429Ala) (c.1298A>C, rs1801131, chr1: 11854476) — условно-патогенным. Сравнительный анализ частот вариантов данного полиморфизма между выборками пациенток с РМШ и женщин с элиминацией ВПЧ не выявил статистически значимых различий для аллеля Т ($p = 0,96$) и генотипа ТТ ($p = 0,75$) локуса rs1801133 гена *MTHFR* (табл. 1, рис. 1), а также аллеля С ($p = 0,475$) и генотипа СС ($p = 0,655$) локуса rs1801131

Таблица 1. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs1801133 гена *MTHFR* ($n = 159$)

Table 1. Results of comparative analysis of frequency distribution of alleles and genotypes of rs1801133 locus of the *MTHFR* gene ($n = 159$)

Группа Group	Частота вероятно рискового аллеля Т Frequency of likely risky allele T	Значение показателей Parameter values	Число генотипов, абс. (частота) Number of genotypes, abs. (frequency)			Значение показателей Parameter values
			ТТ	ТС	СС	
Рак шейки матки ($n = 108$) Cervical cancer ($n = 108$)	0,287	χ^2 -критерий = 0,003; $p = 0,96$; ОШ 1,207 (95 % ДИ 0,720–2,022) χ^2 -test = 0,003; $p = 0,96$; OR 1.207 (95 % CI 0.720–2.022)	7 (0,065)	48 (0,444)	53 (0,491)	χ^2 -критерий = 0,59; $p = 0,75$; χ^2 -test = 0,59; $p = 0,75$
Элиминация вируса папилломы человека ($n = 51$) Elimination of human papilloma virus ($n = 51$)	0,284		2 (0,039)	25 (0,490)	24 (0,471)	

Примечание. Здесь и в табл. 2, 4, 6: ОШ — отношение шансов; ДИ — доверительный интервал.

Note. Here and in tables 2, 4, 6: OR — odds ratio; CI — confidence interval.

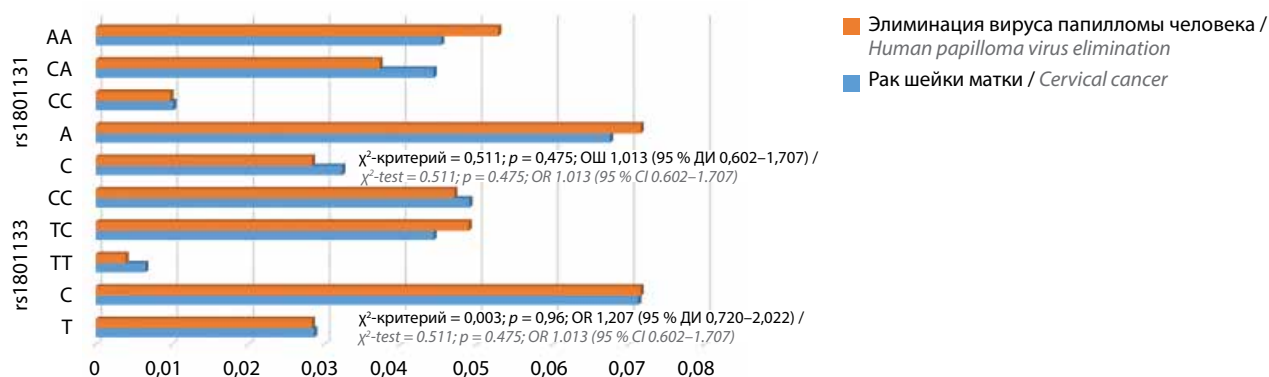


Рис. 1. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локусов rs1801131 и rs1801133 гена *MTHFR*. ОШ — отношение шансов; ДИ — доверительный интервал

Fig. 1. Results of comparative analysis of frequency distributions of alleles and genotypes of rs1801131 and rs1801133 loci of the *MTHFR* gene. OR — odds ratio; CI — confidence interval

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса *rs1801131* гена *MTHFR* ($n = 159$)
Table 2. Results of comparative analysis of frequency distribution of alleles and genotypes of *rs1801131* locus of the *MTHFR* gene ($n = 159$)

Группа Group	Частота вероятно рискового аллеля C Frequency of likely risky allele C	Значение показателей Parameter values	Число генотипов, абс. (частота) Number of genotypes, abs. (frequency)			Значение показателей Parameter values
			CC	CA	AA	
Рак шейки матки ($n = 108$) Cervical cancer ($n = 108$)	0,324	χ^2 -критерий = 0,511; $p = 0,475$; ОШ 1,013 (95 % ДИ 0,602–1,707)	11 (0,102)	48 (0,444)	49 (0,454)	χ^2 -критерий = 0,845; $p = 0,655$ χ^2 -test = 0,845; $p = 0,655$
Элиминация вируса папилломы человека ($n = 51$) Elimination of human papilloma virus ($n = 51$)	0,284	χ^2 -test = 0,511; $p = 0,475$; OR 1.013 (95 % CI 0.602–1.707)	5 (0,098)	19 (0,373)	27 (0,529)	

гена *MTHFR* (табл. 2, см. рис. 1). Вероятно, патогенность вариантов гена *MTHFR* в первую очередь связана с метаболизмом фолатов [8], а не с развитием РШМ. Поскольку не обнаружено тенденции к ассоциации с предрасположенностью к РШМ, мы посчитали нецелесообразным расширение выборки контрольных образцов.

Анализ полиморфных вариантов в генах *CHEK2* и *MET*.

Согласно результатам исследования у 19,44 % (21/108) пациенток с РШМ обнаружены варианты изменений нуклеотидной последовательности генов *MET* и *CHEK2* с различной клинической значимостью. Всего в генах *MET* и *CHEK2* обнаружено 17 вариантов, в том числе 11 — в гене *MET*, 6 — в гене *CHEK2*, при этом 16 из 17 замен были относительно редкими (менее 5 % случаев).

В гене *CHEK2* выявлены 6 однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP), все они описаны ранее в литературе, или о них имеются упоминания в базах данных. Условно-патогенный миссенс-вариант p.Ile157Thr в гене *CHEK2* (с.470A>G, rs17879961) также описан ранее [13]. Синонимический вариант 1116C>T (p.Ser372=) и интронная замена с.684-107T>G согласно базе данных ClinVar доброкачественны. К вариантам с неизвестной клинической значимостью относятся замены с.972G>C, с.1312C>A и с.1117T>C (табл. 3). Согласно результатам анализа замены с.972G>C и с.1312C>A условно-патогенны, а замена с.1117T>C имеет неизвестную клиническую значимость даже после проведения предсказательного анализа. Для патогенной замены с.972G>C проведено дополнительное исследование.

Миссенс-вариант p.Cys324Trp в гене *CHEK2* (с.972G>C, rs1060502712, chr22: 29095862) неизвестного значения согласно ClinVar, в гетерозиготном состоянии обнаружен у 1 женщины (частота замены — 0,005) с манифестом плоскоклеточного РШМ (T3b1N1M0) в 52 года. Предсказательные компьютерные алгоритмы при анализе *in silico* показали противоречивые данные. С использованием pdb-файла, несущего информацию о нормальной структуре белка, построенной с помощью

SWISS-MODEL, с последующим анализом изменения аминокислотной последовательности в программе DynaMut2 мы выяснили, что данная замена приводит к дестабилизации белка CHEK2 с показателем предсказанного изменения стабильности $-1,5$ ккал/моль ($\Delta\Delta G^{\text{stability}}$). При этом последовательность аминокислот в позициях 321–340 (EATCKLYFYQMLLAVQYLNE) приходится на Helix-структуру белка, что говорит о ее функциональной значимости. Согласно базе данных структур белков AlphaFold замена цистеина в 324-м положении белка «дикого типа» CHEK2 вероятно патогенна (средний показатель патогенности AlphaMissense составляет 0,837). Основным критерием для выбора варианта для дополнительного исследования была большая разница в частоте замены между нашей выборкой и общемировой: 0,005 против 0,000002, что свидетельствует о патогенном потенциале замены. Для аллеля С локуса rs1060502712 гена *CHEK2*, несмотря на его редкую встречаемость, при использовании поправки Холдейна–Энскомба продемонстрирована ассоциация с риском развития РМШ ($p = 0,05$) (табл. 4). В связи с крайней редкостью этого варианта трудно сделать выводы о его вкладе в патогенез РШМ, опираясь исключительно на результаты ассоциативного анализа. Однако, если учитывать область белка, на которую приходится эффект замены, данные DynaMut2 и выявленную ассоциацию с аллелем С, замена с.972G>C гена *CHEK2* может обладать патогенным потенциалом.

В гене *MET* выявлены 11 изменений, 6 из которых описаны ранее, а 5 вариантов не описаны, или данных о них очень мало. Вариант с.1966-18T>G приходится на некодирующую область гена и недоступен алгоритмам анализа структуры белка. Замены с.2962C>T, с.2975C>T, с.3895G>C вероятно патогенны, с.1063G>A и с.979G>C вероятно доброкачественны, с.818C>A, с.406G>A, с.4142C>T, с.979G>A и с.2302A>T имеют противоречивый потенциал патогенности, даже после применения используемых нами алгоритмов (табл. 5). Для замены с.2962C>T проведено дополнительное исследование.

Таблица 3. Варианты гена *CNEK2* у женщин с раком шейки матки (РШМ), проживающих на территории Республики Башкортостан
Table 3. *CNEK2* gene variants in women with cervical cancer living in the Republic of Bashkortostan

Вариант (геномная сборка человека GRCh37) Variant (human genome build GRCh37)	Частота замены в выборке больных (РШМ) Substitution frequency in the patient cohort (cervical cancer)	Частота по базе данных GnomAD Frequency per the GnomAD database	Патоген- ность по базе ClinVar Pathogenicity per the ClinVar database	Локализация в белке Location in the protein	Используемые предикторные программы Used prediction software	Патогенность с точки зрения замены аминокислоты в белке по базе AlphaFold Pathogenicity in the context of amino acid substitution in a protein database per the AlphaFold database	Стабильность и гибкость белка после замены аминокислоты согласно программе DunaMut2, ккал/моль ($\Delta\Delta G$ stability) Protein stability and flexibility after amino acid substitution per DunaMut2 software, kcal/mol ($\Delta\Delta G$ stability)	Результат Result
c.972G>C, p.(Cys324Trp), rs1060502712, chr22: 29095862	1 (0,005)	0,000002	VUS	Helix-структура Helix structure	SIFT, PolyPhen – P; CADD, MetaLR, MutationAssessor – B	0,897 (LP)	–1,5 (LP)	LP (согласно несколь- ким критериям) LP (per some criteria)
c.1312C>A, p.(Asp438Tyr), rs200050883, chr22: 29091178	1 (0,005)	0,0004	VUS, LB	Протеинкиназ- ный домен Protein kinase domain	SIFT, PolyPhen – P; CADD, MetaLR, MutationAssessor – B	0,409 (VUS)	–0,5 (LP)	LP (согласно DunaMut2) LP (per DunaMut2)
c.1117T>C, p.(Lys373Glu), rs74751600, chr22: 29091840	1 (0,005)	0,0006	VUS	T-петля, активи- рующая фосфоли- рование T-loop activating phosphorylation	SIFT, PolyPhen – P; CADD, MetaLR, MutationAssessor – B	0,900 (LP)	1,0 (LB)	VUS (данные противоречивы) VUS (contradictory data)

Примечание. Здесь и в табл. 5: V – доброкачественные замены; LB – вероятно доброкачественные замены; P – патогенные замены; LP – условно-патогенные замены; VUS – вари-
анты с неопределенным значением.
Note. Here and in table 5: B – benign substitutions; LB – likely benign substitutions; P – pathogenic substitutions; LP – liable to be pathogenic substitutions; VUS – variants of unknown significance.

Таблица 4. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs1060502712 гена *CHEK2* ($n = 492$)
Table 4. Results of comparative analysis of frequency distribution of alleles and genotypes of rs1060502712 locus of the *CHEK2* gene ($n = 492$)

Группа Group	Частота вероятно рискового аллеля С Frequency of likely risky allele C	Значения показателей с использованием поправки Холдейна–Энскомба Parameter values with Haldane–Anscombe correction	Число генотипов, абс. (частота) Number of genotypes, abs. (frequency)		
			CC	CG	GG
Рак шейки матки ($n = 108$) Cervical cancer ($n = 108$)	1 (0,005)	χ^2 -критерий = 3,8; $p = 0,05$; ОШ 5,92 (95 % ДИ 0,78–45,1) χ^2 -test = 3,8; $p = 0,05$; OR 5.92 (95 % CI 0.78–45.1)	0 (0)	1 (0,009)	107 (0,991)
Контроль ($n = 384$) Control ($n = 384$)			0 (0)	0 (0,0)	384 (1,0)

Миссенс-вариант p.Arg988Cys в гене *MET* (с.2962C>T, rs34589476, chr7: 116411923) в гетерозиготном состоянии обнаружен у 3 (2,7 %) русских женщин с плоскоклеточным РШМ. Эта замена приходится на 14-й экзон гена *MET*, а изменения в нем и амплификация гена *MET* играют решающую роль в возникновении рака [19]. Несмотря на то что данные ClinVar указывают на доброкачественный характер замены, а предсказательные программы противоречивы, поскольку частота этого варианта в когорте пациенток с РШМ достаточно высока (0,014) и отличается от таковой в базах данных (0,005), мы проанализировали его ассоциацию с предрасположенностью к РШМ с использованием расширенной группы контроля. Выявлены статистически значимые различия в распространенности аллеля Т ($p = 0,002$; $\chi^2 = 9,8$) между группами сравнения, что позволяет сделать вывод о значимости данного варианта в развитии РШМ (табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время проведен ряд исследований, направленных на поиск герминальных замен у пациентов с РШМ для определения генов предрасположенности к заболеванию и их влияния на течение заболевания [20–22], однако их результаты пока незначительны. Популярными сегодня исследования с использованием NGS-технологий открывают возможности для получения большого массива данных, которые, однако, сложно интерпретировать. В данной работе на примере генов *MTHFR*, *MET* и *CHEK2* мы рассмотрели различные алгоритмы анализа влияния однонуклеотидных замен на структуру белка и развитие заболевания. Однако наше исследование имеет ряд ограничений, которые следует учитывать при интерпретации результатов. Прежде всего из-за относительно малого размера выборки (108 пациенток с РШМ и 51 женщина с элиминацией ВПЧ) статистическая мощность исследования невелика, что может негативно влиять на обобщаемость результатов. Отсутствие данных о конкретных

типах ВПЧ с учетом их различного онкогенного потенциала также ограничивает глубину анализа механизмов развития РШМ. Кроме того, учет только спонтанной элиминации ВПЧ, без хирургических вмешательств, оставляет вопрос о факторах, способствующих возникновению РШМ, таких как иммунный статус, без ответа. Такие ограничения подчеркивают необходимость дальнейших исследований для подтверждения и уточнения наших выводов.

Согласно результатам нашей работы полиморфные варианты с.677C>Т и с.1298A>С гена *MTHFR*, выявленные в результате NGS-анализа с использованием кастомной панели, не ассоциированы с риском развития РШМ.

Анализ герминальных однонуклеотидных замен в гене *CHEK2* с неоднозначным эффектом, обнаруженных у пациенток с РШМ, показал, что замена p.(Cys324Trp) (с.972G>C, rs1060502712, chr22: 29095862) гена *CHEK2* является вероятно патогенной и демонстрирует ассоциацию аллеля С с риском развития РМШ ($p = 0,05$), несмотря на то что он встречается редко. При этом на основе данных ClinVar две группы исследователей (Labcorp Genetics, США и Color Diagnostics, LLC DBA Color Health, США) пришли к выводу, что имеющих в настоящее время сведений для определения роли этого варианта в развитии онкологических заболеваний недостаточно. С помощью DynaMut2 выявлено, что замена p.(Asp438Tyr) гена *CHEK2* (с.1312C>A, rs200050883, chr22: 29091178) имеет дестабилизирующий эффект, а это предполагает ее патогенность. Однако согласно базе данных структур белков AlphaFold замена аспарагиновой кислоты в 438-м положении белка «дикого типа» *CHEK2* имеет неопределенную значимость (средний показатель патогенности AlphaMissense — 0,409). К тому же эта замена не влияет на повышение риска развития рака молочной железы и поэтому вероятно доброкачественна [23], однако ее ассоциацию с возникновением других злокачественных опухолей еще предстоит определить.

Таблица 5. Варианты гена MET у женщин с раком шейки матки, проживающих на территории Республики Башкортостан
Table 5. MET gene variants in women with cervical cancer living in the Republic of Bashkortostan

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Вариант (геномная сборка человека GRCh37) Variant (human genome build GRCh37)	Частота замены в выборке больных (РШМ) Substitution frequency in the patient cohort (cervical cancer)	Частота по базе данных GnomAD Frequency per the GnomAD database	Патоген- ность по базе ClinVar Pathogenicity per the ClinVar database	Локализация в белке Location in the protein	Используемые предикторные программы Used prediction software	Патогенность с точки зрения замены аминокислоты в белке Pathogenicity in the context of amino acid substitution in a protein per the AlphaFold database	Стабильность и гибкость белка после замены аминокислоты согласно программе DunaMut2, ккал/моль ($\Delta\Delta G_{stability}$) Protein stability and flexibility after amino acid substitution per DunaMut2 software, kcal/mol ($\Delta\Delta G_{stability}$)	Результат Result
c.2962C>T, p.(Arg988Cys), rs34589476, chr7: 116411923	3 (0,014)	0,005	B, LB	Юкстамембран- ный домен Juxtamembrane domain	SIFT-P, PolyPhen, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B	0,229 (LB)	–0,12 (LP)	LP (согласно данным ассоциативного анализа ($p = 0,001$) и DunaMut2) LP (per association analysis data ($p = 0,001$) and DunaMut2)
c.2975C>T, p.(Thr1010Ile), rs56391007, chr7: 116411990	3 (0,014)	0,012	VUS, B	Юкстамембран- ный домен Juxtamembrane domain	SIFT, PolyPhen – P; MutationAssessor – LP; CADD, MetaLR – B	0,532 (VUS)	–0,57 (LP)	LP (согласно общим критериям) LP (per general criteria)
c.818C>A, p.(Thr273Asn), rs368144654, chr7: 116339956	1 (0,005)	0,0004	VUS, LB	Консервативный домен Sema, участвующий в стабилизации структуры белка Conservative domain Sema stabilizing protein structure	PolyPhen – LP; SIFT, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B	0,173 (LB)	–0,82 (LP)	VUS (данные противоречивы) VUS (contradictory data)

Окончание табл. 5
End of table 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9
c.406G>A, p.(Val136Ile), rs199701987, chr7: 116339544	1 (0,005)	0,0003	VUS, B, LB	Консервативный домен Sema, участвующий в стабилизации структуры белка Conservative domain Sema stabilizing protein structure	SIFT, PolyPhen, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B	0,331 (LB)	–0,1 (LP)	VUS (данные противоречивы) VUS (contradictory data)
c.1063G>A, p.(Glu355Lys), rs561295443, chr7: 116340201.	1 (0,005)	0,00004	VUS, LB	Консервативный домен Sema, участвующий в стабилизации структуры белка Conservative domain Sema stabilizing protein structure	PolyPhen – P; SIFT, MetaLR, CADD, MutationAssessor – B	0,293 (LB)	0,34 (LB)	LB (согласно нескольким критериям) LB (per several criteria)
c.3895G>C, p.(Gly1299Arg), rs2117108658, chr7: 116435805	1 (0,005)	6,195e-7	Не описана Not described	Helix-структура белка Protein helix structure	SIFT, PolyPhen, MetaLR – P; MutationAssessor – LP; CADD – B	0,994 (LP)	–0,85 (LP)	LP (согласно нескольким критериям) LP (per several criteria)
c.4142C>T, p.(Thr1381Ile), rs2117113682, chr7: 116436147	1 (0,005)	0,000002	VUS	Регион взаимодействия с RANBP9 Region of interaction with RANBP9	SIFT – VUS; PolyPhen, MetaLR– P; CADD, MutationAssessor – B	0,107 (LB)	–0,25 (LP)	VUS (данные противоречивы) VUS (contradictory data)
c.979G>A, p.(Ala327Thr), rs2116602432, chr7: 116340117	1 (0,005)	Не описана	Не описана Not described	Helix-структура белка Protein helix structure	MutationAssessor – VUS; SIFT, PolyPhen, CADD, MetaLR – B	0,179 (LB)	–0,27 (LP)	VUS (данные противоречивы) VUS (contradictory data)
c.979G>C, p.(Ala327Pro), rs2116602432, chr7: 116340117	1 (0,005)	Не описана	Не описана Not described	Helix-структура белка Protein helix structure	PolyPhen – P; SIFT, CADD, MetaLR, MutationAssessor – B	0,179 (LB)	0,09 (LB)	LB (согласно нескольким критериям) LB (per several criteria)
c.2302A>T, p.(Asn786Tyr), rs45516592, chr7: 116399482	1 (0,005)	Не описана	Не описана Not described	ИРТ/ТИГ-домен IPT/TIG domain	SIFT – P; PolyPhen, CADD, MetaLR – B; MutationAssessor – LP	0,267 (LB)	–0,06 (LP)	VUS (данные противоречивы) VUS (contradictory data)

Таблица 6. Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs34589476 гена *MET* ($n = 492$)**Table 6.** Results of comparative analysis of frequency distribution of alleles and genotypes of rs34589476 locus of the *MET* gene ($n = 492$)

Группа Group	Частота вероятно рискового аллеля T Frequency of likely risky allele T	Значения показателей с использованием поправки Холдейна—Энскомба Parameter values with Haldane— Anscombe correction	Число (частота) генотипов, абс. Number (frequency) of genotypes, abs.		
			TT	TC	CC
Рак шейки матки ($n = 108$) Cervical cancer ($n = 108$)	0,0139	χ^2 -критерий = 9,8; $p = 0,002$; ОШ 10,76 (95 % ДИ 1,69 – 68,73)	0 (0)	3 (0,028)	105 (0,972)
Контроль ($n = 384$) Control ($n = 384$)	0	χ^2 -test = 9,8; $p = 0,002$; OR 10.76 (95 % CI 1.69 – 68.73)	0 (0)	0 (0)	384 (1,0)

В гене *MET* определены 3 замены, обладающие патогенным потенциалом. Вариант p.(Gly1299Arg) (с.3895G>C, rs2117108658, chr7: 116435805) не описан в ClinVa и встречается крайне редко (6,195e-7), но согласно предсказательным компьютерным программам является патогенным. Среди редких замен наиболее часто наблюдаются замены p.(Thr1010Ile) (с.2975C>T, rs56391007, chr7: 116411990) и p.(Arg988Cys) (2962C>T, rs34589476, chr7: 116411923) в гене *MET* (по 3 случая). Суммарная частота их встречаемости достигает 5,5 %. У 5 из 6 женщин был плоскоклеточный РШМ, у 1 — аденосквамозная карцинома. При этом у носителей замены p.(Arg988Cys) заболевание протекает менее агрессивно. Такие пациентки достигли 3-летней выживаемости и находятся до сих пор под наблюдением. Выживаемость же носителей варианта p.(Thr1010Ile) составила от 8 до 24 мес.

Согласно данным Д.В. Тайнер и соавт., варианты R970C и T992I гена *MET*, также обозначаемые как R988C и T1010I, могут быть факторами предрасположенности к раку при их сочетании с онкогеном, который управляет клеточной пролиферацией, но не влияют напрямую на онкотрансформацию [24]. Таким образом, с учетом патогенеза РШМ эти замены могут быть заменами предрасположенности к РШМ и усиливать онкогенный эффект ВПЧ. Ранее сообщалось, что герминальный вариант T1010I гена *MET*, который встречается менее чем у <1 % людей в популяции, наблюдался у 2 % пациентов с метастатическим раком молочной железы в иммортализованной линии эпителиальных клеток молочной железы MCF-10A, что вызвало выраженные функциональные последствия, включая повышенное образование колоний, миграцию опухолевых клеток и инвазию *in vitro* [25]. Вариант с.2962C>T (R988C) в гене *MET* был обнаружен в клетках плоскоклеточной карциномы легкого [26] и у пациентов с лимфопрлиферативными заболеваниями [27]. Функциональные исследования этого варианта про-

демонстрировали, что замена R988C при введении в зависимую от интерлейкина-3 (IL-3) клеточную линию мелкоклеточного рака легкого регулировала пролиферацию клеток, что приводило к небольшой, но значимой независимости от факторов роста [28]. Кроме этого, показано, что мутация R988C усиливает онкогенез, а именно придает *in vitro* повышенную туморогенность, а также восприимчивость к опухолям легкого у мышей. Это указывает на то, что R988C является мутацией с усилением функции белка [27]. Кроме того, эффект замен с.2962C>T и с.2975C>T приходится на юкстамембранный домен *MET*, который регулирует лигандзависимую интернализацию белка MET как следствие фосфорилирования Y1003 в ответ на связывание фактора роста гепатоцитов (HGF), что приводит к убиквитинированию и деградации MET. Предполагается, что мутации в юкстамембранном домене приводят к накоплению MET на поверхности клетки и постоянной сигнализации, ведущей к опухолеобразующей активности [29]. Для варианта с.2962C>T мы выявили ассоциацию аллеля T с риском развития РШМ ($p = 0,002$; $\chi^2 = 9,8$). Таким образом, варианты с.2975C>T и 2962C>T в гене *MET*, по нашему мнению, нуждаются в дальнейшем исследовании для подтверждения их значимости в предрасположенности к РШМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение влияния герминальных вариантов нуклеотидных замен с использованием различных биоинформатических инструментов является одним из основных путей изучения патогенеза РШМ. В лечении и профилактике онкологических заболеваний необходимо применять индивидуальный подход, а дальнейшее исследование молекулярно-генетических механизмов развития рака, в том числе РШМ, служит необходимым условием для разработки персонализированных подходов к профилактике и терапии злокачественных новообразований.

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

- World Health Organization. Human papillomavirus and cancer Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papilloma-virus-and-cancer>.
- Беглярзаде С.А., Мухаметова Р.Р., Жао Б. Перспективы комплексного скрининга и терапии рака шейки матки. Креативная хирургия и онкология 2024;14(1):60–8. DOI: 10.24060/2076-3093-2024-14-1-60-68
- Beglyarzade S.A., Mukhametova R.R., Zhao B. Prospects for comprehensive screening and treatment of cervical cancer. *Kreativnaya hirurgiya i onkologiya = Creative Surgery and Oncology* 2024;14(1):60–8. (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2024-14-1-60-68
- Okunade K.S. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol* 2020;40(5):602–8. DOI: 10.1080/01443615.2019.1634030
- Бриль Ю.А., Раевская О.А. «Бозоны Хиггса» цервикальной неоплазии. Гинекология, акушерство, бесплодный брак 2019; 3:74–81. Bril Yu.A., Raevskaya O.A. “Higgs bosons” of cervical neoplasia. *Ginekologiya, akusherstvo, besplodnyi brak = Gynecology, Obstetrics, Infertility marriage* 2019;3:74–81. (In Russ.).
- Ленкова К.В., Хусайнова Р.И., Миннихметов И.Р. Молекулярно-генетические основы рака шейки матки. Молекулярная медицина 2023;4:25–33. DOI: 10.29296/24999490-2023-04-04
- Lenkova K.V., Khusainova R.I., Minniakhmetov I.R. Molecular and genetic bases of cervical cancer. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine* 2023;4:25–33. (In Russ.). DOI: 10.29296/24999490-2023-04-04
- Chanock S.J. How the germline informs the somatic landscape. *Nat Genet* 2021;53(11):1523–5. DOI: 10.1038/s41588-021-00960-6
- Srinivasan P., Bandalamudi C., Jonsson P. et al. The context-specific role of germline pathogenicity in tumorigenesis. *Nat Genet* 2021;53(11):1577–85. DOI: 10.1038/s41588-021-00949-1
- Hajiesmaeil M., Tafvizi F., Sarmadi S. The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on susceptibility to human papilloma virus infection and cervical cancer. *Infect Genet Evol* 2016;46:1–6. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.10.012
- Yi K., Yang L., Lan Z. et al. The association between MTHFR polymorphisms and cervical cancer risk: a system review and meta analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2016;294(3):579–88. DOI: 10.1007/s00404-016-4037-6
- Wang Z., Li K., Ouyang L. et al. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphisms on breast, cervical, ovarian, and endometrial cancer susceptibilities. *Chronic Dis Transl Med* 2021;12(7):169–81. DOI: 10.1016/j.cdtm.2021.06.003
- Stolarova L., Kleiblova P., Janatova M. et al. CHEK2 germline variants in cancer predisposition: stalemate rather than checkmate. *Cells* 2020;12(9):2675. DOI: 10.3390/cells9122675
- Yang X., Liao H.Y., Zhang H.H. Roles of MET in human cancer. *Clin Chim Acta* 2022;15:525:69–83. DOI: 10.1016/j.cca.2021.12.017
- Миннихметов И.Р., Забелин М.В., Ольков И.Г. Пилотный проект по скринингу рака шейки матки с применением ВПЧ-тестирования. Вопросы онкологии 2020;66(6):618–24. DOI: 10.37469/0507-3758-2020-66-6-618-624
- Minniakhmetov I.R., Zabelin M.V., Olkov I.G. A pilot project for cervical cancer screening using HPV testing. *Voprosy onkologii - Oncology Issues* 2020;66(6):618–24. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2020-66-6-618-624
- Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405–24. DOI: 10.1038/gim.2015.30
- Abou Tayoun A.N., Pesaran T., DiStefano M.T. et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat* 2018;39(11):1517–24. DOI: 10.1002/humu.23626
- Brnich S.E., Abou Tayoun A.N., Couch F.J. et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Med* 2019;12:3. DOI: 10.1186/s13073-019-0690-2
- Rodrigues C.H.M., Pires D.E.V., Ascher D.B. DynaMut2: assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci* 2021;30(1):60–9. DOI: 10.1002/pro.3942
- Fleiss J.L., Levin B., Paik M.C. Statistical methods for rates and proportions 3rd edn. Hoboken, New Jersey John Wiley and Sons, Inc., 2003. 200 p.
- Mo H.N., Liu P. Targeting *MET* in cancer therapy. *Chronic Dis Transl Med* 2017;19;3(3):148–53. DOI: 10.1016/j.cdtm.2017.06.002
- Qiu L., Feng H., Yu H. et al. Characterization of the genomic landscape in cervical cancer by next generation sequencing. *Genes (Basel)* 2022;13(2):287. DOI: 10.3390/genes13020287
- Wen H., Xu Q., Sheng X. et al. Prevalence and landscape of pathogenic or likely pathogenic germline variants and their association with somatic phenotype in unselected chinese patients with gynecologic cancers. *JAMA Netw Open* 2023;3;6(7):e2326437. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.26437
- Lenkova K., Khusainova R., Minyazeva R. et al. Germline variants in proto-oncogenes and tumor suppressor genes in women with cervical cancer. *Biomedicines* 2024;12(11):2454. DOI: 10.3390/biomedicines12112454
- Kumpula T.A., Koivuluoma S., Soikkonen L. et al. Evaluating the role of CHEK2 p.(Asp438Tyr) allele in inherited breast cancer predisposition. *Fam Cancer* 2023;22(3):291–4. DOI: 10.1007/s10689-023-00327-2
- Tyner J.W., Fletcher L.B., Wang E.Q. et al. MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Res* 2010;1;70(15):6233–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0429
- Agarwal D., Hatzis C., Pusztai L. Functional polymorphisms in cancer. *Oncoscience* 2015;20;2(2):73–4. DOI: 10.18632/oncoscience.129
- Guyard A., Danel C., Théou-Anton N. et al. Morphologic and molecular study of lung cancers associated with idiopathic pulmonary fibrosis and other pulmonary fibroses. *Respir Res* 2017;15;18(1):120. DOI: 10.1186/s12931-017-0605-y
- MTjin E.P., Groen R.W., Vogelzang I. et al. Functional analysis of HGF/MET signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2006;15;107(2):760–8. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1929
- Ma P.C., Kijima T., Maulik G. et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 2003;1;63(19):6272–81.
- Liu S., Meric-Bernstam F., Parinyanitkul N. et al. Functional consequence of the MET-T1010I polymorphism in breast cancer. *Oncotarget* 2015;20;6(5):2604–14. DOI: 10.18632/oncotarget.3094

Вклад авторов

К.В. Ленкова, Р.М. Минязева, В.Л. Ахметова, И.Р. Гилязова: проведение исследований;
Р.И. Хусаинова, И.Р. Миннихметов: разработка дизайна исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

K.V. Lenkova, R.M. Minzyaeva, V.L. Akhmetova, I.R. Gilyazova: conducting the research;
R.I. Khusainova, I.R. Minniakhmetov: developing the research design, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.В. Ленкова / K.V. Lenkova: <https://orcid.org/0000-0001-5903-0085>
Р.М. Минязева / R.M. Minzyaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5542-9531>
В.Л. Ахметова / V.L. Akhmetova: <https://orcid.org/0000-0002-1874-0774>
И.Р. Гилязова / I.R. Gilyazova: <https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>
Р.И. Хусаинова / R.I. Khusainova: <https://orcid.org/0000-0002-8643-850X>
И.Р. Миннихметов / I.R. Minniakhmetov: <https://orcid.org/0000-0002-7045-8215>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Статья подготовлена без спонсорской поддержки.

Funding. The article was prepared without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Института биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (протокол № 19 от 25.11.2021).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

The study protocol was approved by the biomedical ethics of the Institute of Biochemistry and Genetics of the of Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 19 dated 25.11.2021).

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

Статья поступила: 04.12.2024. **Принята к публикации:** 10.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 04.12.2024. **Accepted for publication:** 10.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-96-108>

Протеомный анализ плазмы крови как инструмент для персонализированной диагностики аденокарциномы легкого

Д.Н. Коробков¹, А.С. Кононихин², С.Д. Семенов^{2,3}, Е.Л. Кордзая⁴, А.Г. Бржозовский², А.Е. Бугрова^{2,5}, Е.Ю. Васильева^{4,6}, Д.Ю. Каннер¹, Е.Н. Николаев², А.А. Комиссаров^{4,6}

¹ГБУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 143515 Московская обл., п. Истра, 27;

²АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»; Россия, 121205 Москва, территория инновационного центра «Сколково», Большой бульвар, 30 стр. 1;

³ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; Россия, 117303 Москва, ул. Керченская, 1а, корп. 1;

⁴ГБУЗ «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 109240 Москва, ул. Яузская, 11/6;

⁵ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4;

⁶ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России; Россия, 127006 Москва, ул. Долгоруковская, 4

Контакты: Алексей Александрович Комиссаров kommisarovlexa@yandex.ru, Евгений Николаевич Николаев e.nikolaev@skoltech.ru

Введение. Рак легкого занимает 2-е место по частоте заболеваемости и 1-е место по смертности среди других онкологических патологий. Несмотря на значительный успех в диагностике и лечении опухолей, 5-летняя выживаемость при данной патологии на протяжении многих лет составляет всего 19 %, что в значительной степени связано с поздним выявлением заболевания. Кроме того, развитие метастазов снижает показатели 5-летней выживаемости до 6 %.

Цель исследования – проанализировать протеом плазмы крови здоровых добровольцев и пациентов с аденокарциномой легкого (АКЛ) как одной из наиболее распространенных форм рака легкого для идентификации белков, являющихся потенциальными биомаркерами данной патологии и наличия отдаленных метастазов.

Материалы и методы. В исследование включены 30 здоровых добровольцев и 30 пациентов с диагностированной АКЛ. С применением жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии в сочетании с методом мониторинга множественных реакций мы проанализировали представленность широкого спектра белков в плазме крови участников исследования. Полученные данные оценены с помощью современных методов биологической статистики, в том числе с использованием алгоритмов машинного обучения.

Результаты. На основании результатов количественного анализа 118 белков плазмы крови в экспериментальных группах мы предложили панель из 12 значимых белков, являющихся специфическими маркерами АКЛ. Дополнительно идентифицированы 3 белка, позволяющие предсказывать наличие отдаленных метастазов у пациентов с АКЛ. Классификаторы, построенные на основании данных панелей белков, позволяют различать пациентов с АКЛ и здоровых лиц, а также выявлять метастазы у больных АКЛ с чувствительностью и специфичностью более 90 %.

Заключение. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых тестов для скрининга АКЛ и прогнозирования исходов заболевания на основании протеома плазмы крови. После дополнительной валидации и внедрения в клиническую практику эти тесты будут способствовать ранней диагностике АКЛ и, как следствие, повышению выживаемости пациентов.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белок, биомаркер, протеомика, рак легкого, аденокарцинома легкого, метастазы

Для цитирования: Коробков Д.Н., Кононихин А.С., Семенов С.Д. и др. Протеомный анализ плазмы крови как инструмент для персонализированной диагностики аденокарциномы легкого. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(1):96–108.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-96-108>

Proteomic analysis of blood plasma as a tool for personalized diagnosis of lung adenocarcinoma

D.N. Korobkov¹, A.S. Kononikhin², S.D. Semenov^{2,3}, H.L. Kordzaya⁴, A.G. Brzhozovskiy², A.E. Bugrova^{2,5}, E.Yu. Vasilieva^{4,6}, D.Yu. Kanner¹, E.N. Nikolaev², A.A. Komissarov^{4,6}

¹Moscow City Oncological Hospital No. 62, Moscow Healthcare Department; 27 Istra, Moscow Region 143515, Russia;

²Skolkovo Institute of Science and Technology; Bld. 1, 30 Bolshoy Bul'var, Moscow 121205, Russia;

³Moscow Institute of Physics and Technology; Bld. 1, 1a Kerchenskaya St., Moscow 117303, Russia;

⁴Moscow City Clinical Hospital named after I.V. Davydovsky, 11/6 Yauzskaya St., Moscow 109240, Russia;

⁵Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Science; 4 Kosygina St., Moscow 119334, Russia;

⁶Russian University of Medicine; 4 Dolgorukovskaya St., Moscow 127006, Russia

Contacts: Alexey Aleksandrovich Komissarov komissarovlexa@yandex.ru, Evgeniy Nikolaevich Nikolaev e.nikolaev@skoltech.ru

Introduction. Lung cancer ranks second in incidence and first in mortality among other oncological pathologies. Despite significant success in the diagnosis and treatment of tumors, the five-year survival rate for lung cancer is only 19 % and has not improved significantly in recent decades, which is mainly associated with late detection of the disease. In addition, the development of metastases reduces the five-year survival rate to 6 %.

Aim. To analyze the plasma proteome of healthy volunteers and patients with lung adenocarcinoma (LAC), as one of the most common forms of lung cancer, to identify proteins that are potential biomarkers of LAC and of the presence of distant metastases.

Materials and methods. The study included 30 healthy donors and 30 patients with diagnosed LAC. Using a combination of liquid chromatography and tandem mass spectrometry in combination with the method of multiple reactions monitoring, we analyzed the representation of a wide range of proteins in the blood plasma of the study participants. The data obtained were analyzed using modern methods of biological statistics, including machine learning algorithms.

Results. Based on the quantitative analysis of 118 proteins in blood plasma between the experimental groups, we proposed a panel of 12 significant proteins that are specific markers of LAC. Additionally, we identified three proteins that predict the presence of distant metastases among patients with LAC. Classifiers developed based on these protein panels make it possible to distinguish between patients with LAC and healthy controls, as well as to detect the presence of metastases among patients with LAC, with sensitivity and specificity of more than 90 %.

Conclusion. The data obtained can be used to develop new tests for LAC screening and predicting disease outcomes based on the blood plasma proteome. After additional validation and implementation into clinical practice, these tests can contribute to the early diagnosis of LAC and, as a result, increase patient survival.

Keywords: mass spectrometry, protein, biomarker, proteomics, lung cancer, lung adenocarcinoma, metastases

For citation: Korobkov D.N., Kononikhin A.S., Semenov S.D. et al. Proteomic analysis of blood plasma as a tool for personalized diagnosis of lung adenocarcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(1):96–108. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-1-96-108>

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным мировой статистики в настоящее время рак легкого (РЛ) занимает 2-е место по частоте заболеваемости и 1-е место по смертности среди других онкологических патологий [1, 2]. В Российской Федерации РЛ составляет около 11 % всех вновь диагностированных онкологических заболеваний (~60 тыс. случаев в год) и ежегодно уносит жизнь приблизительно 50 тыс. человек [3]. Примечательно, что в 15 % случаев РЛ выявляют у людей, которые никогда не курили, а в 50 % — у тех, кто бросил курить. При этом 5-летняя выживаемость при РЛ на протяжении долгого времени составляет всего 19 %, что в значительной степени связано с диагностикой заболевания на поздних стадиях. Кроме того, развитие метастазов снижает показатели 5-летней выживаемости до 6 %.

В связи с этим актуальным направлением современных биомедицинских исследований является создание малоинвазивных методов исследования и скрининга

пациентов с РЛ. Результаты подобных исследований могут стать основой для разработки новых эффективных подходов для ранней диагностики РЛ. В настоящее время основным методом оценки состояния легких при диспансеризации является проведение флюорографического исследования, которое выявляет новообразования на поздних стадиях. Компьютерная томография — обнадеживающий, но довольно дорогой и ресурсозатратный метод диагностики и потому не может быть использована при проведении массовой диспансеризации населения; к тому же она часто дает ложноположительные результаты [4]. Таким образом, сегодня крайне востребованы исследования, направленные на разработку новых подходов к диагностике РЛ и оценке состояния пациентов.

Достижения последних лет в области молекулярной биологии привели к созданию высокопроизводительных методов, позволяющих анализировать сотни и тысячи биологически активных молекул в одном образце.

Эти методы лежат в основе так называемых омических технологий, которые представляют собой подходы к детекции широкого спектра молекул, включая ДНК, РНК, белки и их производные [5]. Данные технологии позволяют получить детальную характеристику биологических образцов за относительно короткое время и с низкими трудозатратами, что делает их ценным инструментом для современных биомедицинских исследований.

В норме в организме человека управление физиологическими процессами и органами со стороны регуляторной системы во многом осуществляется через кровь. Кроме того, ряд патологических процессов, в частности онкологические и инфекционные заболевания, способны оказывать влияние на ее состав. Все это позволяет рассматривать кровь (и ее компоненты) как универсальный информационный центр, из которого можно получать данные о состоянии организма, например, исследуя ее с помощью омических технологий. Белки в живых организмах выполняют широкий спектр функций, часто выступая главными участниками или регуляторами физиологических процессов, причем как в норме, так и при патологиях. В связи с этим протеомный анализ крови и других биологических жидкостей с использованием масс-спектрометрии уже нашел применение в нескольких областях медицины. Он применяется для оценки токсикологического действия лекарственных препаратов [6], определения концентрации гормонов и белков иммунной системы [7, 8], а также для выявления наследственных патологий у новорожденных [9]. Кроме того, результаты ряда исследований показали, что масс-спектрометрический анализ протеома крови может служить основой для разработки методов диагностики различных заболеваний человека [10]. Благодаря малоинвазивному, быстрому и безопасному забору кровь может быть удобным диагностическим образцом, используемым в персонализированных приборах мониторинга состояния организма (так называемая жидкая биопсия) [11, 12]. Забор такой пробы может быть осуществлен даже в очень тяжелых случаях и повторен через короткие интервалы времени. Таким образом, количественные измерения белкового профиля (протеома) крови с помощью масс-спектрометрии могут стать удобным инструментом для разработки новых эффективных методов диагностики РЛ и отслеживания течения заболевания.

В настоящей работе методом таргетной (целевой) высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) на основе мониторинга множественных реакций (MRM) проведен мультиплексный анализ 118 белков в плазме крови 30 здоровых добровольцев и 30 пациентов с аденокарциномой легкого (АКЛ). В результате исследования предложена панель из 12 белков плазмы крови, рассматриваемая как специфичная белковая сигнатура АКЛ. С использованием этой панели разработан классификатор, позволяющий выявлять пациентов

с АКЛ с 95 % точностью. Кроме того, разработана панель из 3 белков плазмы, являющихся потенциальными маркерами отдаленных метастазов у пациентов с АКЛ. Представленность двух из них в плазме крови пациентов с АКЛ позволяет выявить метастатическое поражение с чувствительностью и специфичностью более 90 %.

Цель исследования — проанализировать протеом плазмы крови здоровых добровольцев и пациентов с АКЛ как одной из наиболее распространенных форм рака легкого для идентификации белков, являющихся потенциальными биомаркерами данной патологии и наличия отдаленных метастазов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования и исследуемые образцы.

В исследование включены 30 пациентов с АКЛ, которые получали лечение в Московской городской онкологической больнице № 62, а также 30 здоровых добровольцев, наблюдавшихся в консультативно-диагностическом центре на базе Городской клинической больницы им. И.В. Давыдовского (г. Москва). Всем участникам проведены физикальный осмотр, инструментальное обследование, а также выполнен забор венозной крови с последующим выделением и криоконсервацией плазмы. Диагноз АКЛ устанавливали на основании данных компьютерной томографии органов грудной клетки и иммуногистохимического исследования биопсийного материала. Критериями включения в группу здоровых добровольцев являлось отсутствие онкологических заболеваний (как в момент включения, так и в анамнезе), вируса иммунодефицита человека и острых вирусных заболеваний.

Характеристика участников исследования представлена в табл. 1.

Протеомный анализ плазмы крови. Десять мкл плазмы крови растворяли в буфере, содержащем 7,2 М мочевины, 16 мМ дитиотреитола (DTT) и 240 мМ TrisHCl (pH 8,0), и инкубировали 30 мин при 37 °С для денатурации белков и восстановления —SH групп цистеинов. Для алкилирования добавляли 40 мМ йодацетамида и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Для трипсинолиза добавляли трипсин (Trypsin gold, Promega, США) в соотношении фермент — белок 1:25 и инкубировали образцы в течение ночи (18 ч) при 37 °С. В конце гидролиз тормозили подкислением среды 1,0 % муравьиной кислоты (FA), pH ≤2. Расчетная концентрация полученной пептидной смеси в гидролизате составляла 1 мкг/мкл.

Протеомный анализ проводили с использованием ВЭЖХ-МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Для количественного анализа использовали набор синтетических меченных стабильными изотопами пептидных стандартов (SIS), который добавляли в каждую пробу-гидролизат в качестве внутреннего стандарта для измерения соответствующих белков плазмы крови. Для анализа 10 мкл каждого образца наносили для разделения на колонку Zorbax

Таблица 1. Характеристика участников исследования**Table 1.** Characteristics of the study participants

Параметр Parameter	Пациенты с аденокарциномой легкого (<i>n</i> = 30) Patients with lung adenocarcinoma (<i>n</i> = 30)	Здоровые добровольцы (<i>n</i> = 30) Healthy volunteers (<i>n</i> = 30)	<i>p</i>
Число мужчин, <i>n</i> (%) Number of males, <i>n</i> (%)	23 (77)	13 (43)	0,017
Возраст (межквартильный размах), лет Age (interquartile range), years	61,9 (55,6–68,9)	52,3 (46,5–59,2)	0,020
Курящие, <i>n</i> (%) Smokers, <i>n</i> (%)	22 (73)	6 (20)	<0,001
Индекс массы тела (межквартильный размах), кг/м ² Body mass index (interquartile range), kg/m ²	25,8 (23,0–29,0)	25,8 (22,9–28,8)	0,834
Дебют заболевания, <i>n</i> (%) Disease onset, <i>n</i> (%)	17 (57)	—	—
Стадия заболевания, <i>n</i> (%): Disease stage, <i>n</i> (%):			
I	1 (3)	—	—
II	1 (3)	—	—
III	13 (44)	—	—
IV	15 (50)	—	—
Метастазы, <i>n</i> (%) Metastases, <i>n</i> (%)	16 (53)	—	—
Иммунотерапия в анамнезе, <i>n</i> (%) History of immunotherapy, <i>n</i> (%)	11 (37)	—	—
Лучевая терапия в анамнезе, <i>n</i> (%) History of radiotherapy, <i>n</i> (%)	7 (23)	—	—

Примечание. Жирным шрифтом обозначены значения уровня достоверности $p < 0,05$.

Note. Significance level $p < 0.05$ is highlighted in bold.

Eclipse Plus с обращенной фазой (RP-UHPLC) ($2,1 \times 150$ мм, диаметр частиц 1,8 мкм; Agilent, США) с использованием ВЭЖХ-системы ExionLC™ (Thermo-Fisher Scientific, США). Пептиды разделяли при скорости потока 0,4 мл/мин в течение 60 мин с помощью многоступенчатого градиента. Параметры для ВЭЖХ-МС-анализа адаптированы и оптимизированы на основе результатов предыдущих исследований [13].

Статистический анализ данных. Количественный анализ данных ВЭЖХ-МС проводили с использованием программного обеспечения Skyline Quantitative Analysis (версия 20.2.0.343). Статистический анализ и визуализацию данных выполняли с помощью Python (3.7.3) с применением пакетов SciPy, Seaborn, Matplotlib, Pandas и Scikit-learn.

Значимые различия в концентрациях белков в группах пациентов оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, поправки на множественные сравнения с применением метода Бенджамини–Хохберга, а также коэффициента *d* Коэна. Для визуализации многомерных данных использовали метод главных компонент (PCA).

В качестве классификационной модели применяли модель логистической регрессии как с L1-регуляризацией (регрессия LASSO), так и без нее. Важность признаков рассчитывали как модуль веса признака, нормированный нормой L2. Перед проведением анализа данные были логарифмированы по основанию 2, отсутствующие значения заполнены значениями из нормального распределения, параметры которого определялись по соответствующим подвыборкам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По сравнению со здоровыми добровольцами ($n = 30$) пациенты с АКЛ ($n = 30$) были значительно старше. Также в группе АКЛ мужчин и курящих было больше, чем в группе контроля (см. табл. 1), что ожидаемо, поскольку данные параметры являются общеизвестными факторами риска развития РЛ [14].

Помимо клинических данных участников исследования мы проанализировали представленность широкого спектра белков в плазме периферической крови с помощью метода таргетной (целевой) ВЭЖХ-МС на основе мониторинга MRM [15] с использованием SIS.

Таблица 2. Белки плазмы крови, дифференциально представленные в экспериментальных группах
Table 2. Plasma proteins differentially abundant in the experimental groups

Белок Protein	Коэффициент d Коэна Cohen's d	Представленность белка в плазме* Protein abundance in plasma*		p	q**
		Аденокарцинома легкого (n = 30) Lung adenocarcinoma (n = 30)	Контроль (n = 30) Control (n = 30)		
α-1-кислый гликопротеин (A1AG1) α-1-acid glycoprotein (A1AG1)	1,43	9,72 (9,44–10,26)	10,52 (10,13–11,14)	$4,58 \times 10^{-6}$	$8,92 \times 10^{-5}$
α-1-антитрипсин (A1AT) α-1 antitrypsin (A1AT)	1,85	11,91 (11,77–12,10)	12,47 (12,31–12,64)	$5,08 \times 10^{-8}$	$2,97 \times 10^{-6}$
Богатый лейцином α-2-гликопротеин (A2GL) Leucin-rich α-2 glycoprotein	2,12	5,46 (5,29–5,82)	6,68 (6,14–7,17)	$1,10 \times 10^{-8}$	$1,29 \times 10^{-6}$
Цитидин-дезаминаза APOBEC-3F (ABC3F) Cytidine deaminase APOBEC-3F (ABC3F)	0,83	7,42 (7,20–7,58)	7,69 (7,50–7,83)	$2,15 \times 10^{-3}$	$8,13 \times 10^{-3}$
Аполипопротеин В-100 (APOB) Apolipoprotein B-100 (APOB)	0,81	4,95 (4,14–5,22)	5,56 (5,00–6,04)	$3,58 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^{-2}$
Антиген CD44 CD44 antigen	1,05	1,57 (1,35–1,80)	1,99 (1,68–2,16)	$2,25 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-3}$
Фактор I системы комплемента (CFAI) Complement factor I (CFAI)	1,09	5,22 (5,00–5,47)	5,53 (5,43–5,64)	$8,14 \times 10^{-5}$	$8,65 \times 10^{-4}$
β-Ala-His дипептидаза (CNDP1) β-Ala-His dipeptidase (CNDP1)	–1,02	2,31 (2,11–2,58)	1,90 (1,69–2,15)	$1,78 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-3}$
Фактор C2 системы комплемента (CO2) Complement factor C2 (CO2)	0,98	2,85 (2,67–3,08)	3,19 (3,02–3,37)	$4,10 \times 10^{-4}$	$2,35 \times 10^{-3}$
Фактор C5 системы комплемента (CO5) Complement factor C5 (CO5)	0,86	5,72 (5,50–5,90)	5,93 (5,69–6,09)	$3,76 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^{-2}$
Фактор C8 системы комплемента, α-цепь (CO8A) Complement factor C8, α chain (CO8A)	0,86	5,41 (5,22–5,58)	5,71 (5,52–5,85)	$6,03 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-3}$
Фактор C8 системы комплемента, β-цепь (CO8B) Complement factor C8, β chain (CO8B)	1,17	2,88 (2,77–3,07)	3,30 (3,06–3,52)	$5,60 \times 10^{-5}$	$6,55 \times 10^{-4}$
Фактор C9 системы комплемента (CO9) Complement factor C9 (CO9)	1,55	4,75 (4,26–4,95)	5,49 (5,12–5,72)	$2,78 \times 10^{-7}$	$1,08 \times 10^{-5}$
С-реактивный белок (CRP) C-reactive protein (CRP)	1,03	2,17 (1,28–3,53)	4,16 (2,54–6,08)	$1,06 \cdot 10^{-3}$	$4,27 \cdot 10^{-3}$
Цистатин С (CYTC) Cystatin C (CYTC)	0,94	3,57 (3,39–3,66)	3,82 (3,62–3,93)	$3,87 \times 10^{-4}$	$2,35 \times 10^{-3}$
Фиколин-2 (FCN2) Ficolin 2 (FCN2)	0,81	1,46 (1,01–1,83)	2,16 (1,58–2,40)	$2,89 \times 10^{-3}$	$9,95 \times 10^{-3}$
Гемопексин (HEMO) Hemopexin (HEMO)	1,13	10,75 (10,60–10,86)	11,03 (10,80–11,14)	$1,63 \times 10^{-4}$	$1,36 \times 10^{-3}$
Ингибитор протеазы C1 плазмы (IC1) Plasma protease C1 inhibitor (IC1)	1,52	7,50 (7,36–7,65)	7,88 (7,65–8,07)	$6,49 \times 10^{-7}$	$1,90 \times 10^{-5}$
Белок-2, связывающий инсулиноподоб- ный фактор роста (IGFBP2) Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	1,23	1,55 (1,09–1,90)	2,34 (1,96–2,55)	$2,96 \times 10^{-5}$	$4,33 \times 10^{-4}$

Окончание табл. 2

End of table 2

Белок Protein	Коэффициент d Cohen's d	Представленность белка в плазме* Protein abundance in plasma*		p	q**
		Аденокарцинома легкого (n = 30) Lung adenocarcinoma (n = 30)	Контроль (n = 30) Control (n = 30)		
Плазменный ингибитор сериновых протеиназ (IPSP) Plasma serine proteinase inhibitor (IPSP)	−0,98	5,85 (5,63–6,00)	5,53 (5,25–5,80)	$3,56 \times 10^{-4}$	$2,31 \times 10^{-3}$
Каллистатин (KAIN) Kallistatin (KAIN)	−0,96	3,26 (3,09–3,48)	3,02 (2,92–3,28)	$1,03 \times 10^{-3}$	$4,27 \times 10^{-3}$
Липополисахарид-связывающий белок (LBP) Liposaccharide-binding protein (LBP)	1,14	4,57 (4,12–4,79)	5,04 (4,91–5,83)	$1,25 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-3}$
L-селектин (LYAM1) L-selectin (LYAM1)	−0,99	6,00 (5,90–6,19)	5,74 (5,57–6,04)	$5,56 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-3}$
Лизоцим С (LYSC) Lysozyme C (LYSC)	1,26	3,73 (3,55–3,88)	4,27 (3,97–4,51)	$6,05 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-4}$
Маннозсвязывающая лектин-ассоции- рованная сериновая протеаза 2 (MASP2A) Mannose-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP2A)	0,85	6,07 (5,11–6,40)	6,55 (6,18–6,96)	$2,82 \times 10^{-3}$	$9,95 \times 10^{-3}$
Маннозсвязывающий лектин (MBL2) Mannose-binding lectin (MBL2)	1	4,52 (3,71–5,17)	5,58 (4,84–6,22)	$4,22 \times 10^{-4}$	$2,35 \times 10^{-3}$
Нейропилин 2 (NRP2) Neuropilin 2 (NRP2)	0,92	6,94 (6,80–7,16)	7,24 (7,06–7,45)	$9,49 \times 10^{-4}$	$4,27 \times 10^{-3}$
Фосфатидилинозитол-гликанспецифиче- ская фосфолипаза D (PHLD) Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D (PHLD)	−0,89	4,85 (4,64–5,04)	4,64 (4,25–4,83)	$2,56 \times 10^{-3}$	$9,36 \times 10^{-3}$
Пластин L (PLSL) Plastin L (PLSL)	0,99	2,96 (2,81–3,19)	3,13 (3,04–3,55)	$1,03 \times 10^{-3}$	$4,27 \times 10^{-3}$
Пропердин (PROP) Properdin (PROP)	1	6,75 (6,51–6,86)	7,06 (6,84–7,25)	$5,69 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-3}$
Витамин К-зависимый гликопротеин S (PROS) Vitamin K-dependent glycoprotein S (PROS)	1,25	5,22 (4,97–5,36)	5,48 (5,37–5,58)	$3,36 \times 10^{-5}$	$4,37 \times 10^{-4}$
Ретинолсвязывающий белок 4 (RET4) Retinol-binding protein 4 (RET4)	−0,83	6,93 (6,86–7,26)	6,71 (6,47–7,04)	$1,76 \times 10^{-3}$	$6,88 \times 10^{-3}$
Сывороточный амилоидный белок A1 (SAA1) Serum amyloid protein A1 (SAA1)	0,95	2,51 (1,59–3,62)	3,70 (3,18–8,19)	$5,87 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-3}$
Тенасцин-X (TENX) Tenascin X (TENX)	1,45	4,95 (4,68–5,44)	5,96 (5,49–6,56)	$3,57 \times 10^{-6}$	$8,35 \times 10^{-5}$
Тетранектин (TETN) Tetranectin (TETN)	−0,97	8,40 (8,31–8,63)	8,22 (7,90–8,42)	$3,76 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^{-2}$
Цинк-α-2-гликопротеин (ZA2G) Zinc α 2 glycoprotein (ZA2G)	1,1	4,99 (4,74–5,15)	5,25 (5,09–5,36)	$2,19 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-3}$

*Представленность белков указана в относительных единицах, рассчитанных на основании статистической обработки масс-спектрометрических данных, в виде медианы (межквартильного интервала). **Значение достоверности p с поправкой на множественные сравнения с помощью процедуры Бенджамини–Хохберга.

*Protein abundance is presented in relative units calculated based on statistical processing of mass spectrometry data as median (interquartile range).

**Significance level p adjusted for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg procedure.

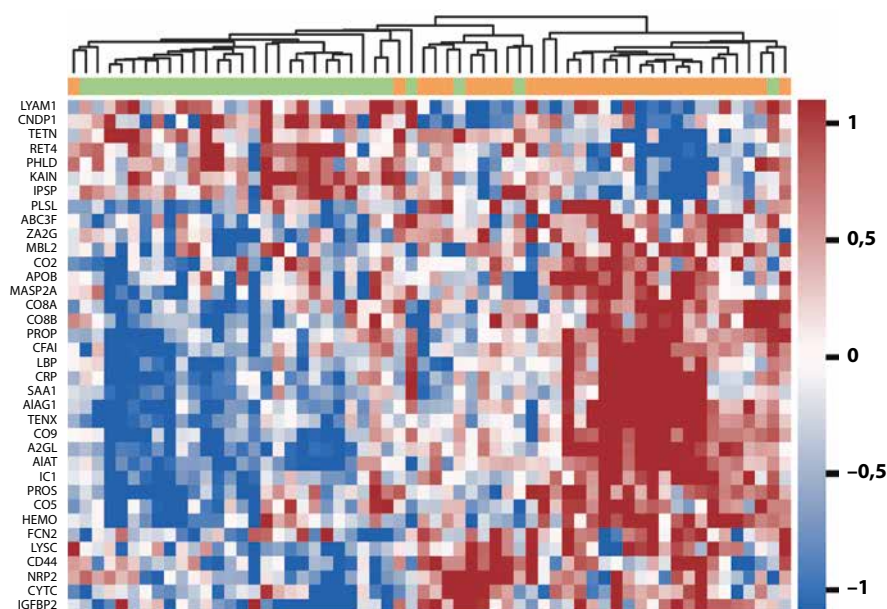


Рис. 1. Потенциальные белковые маркеры аденокарциномы легкого. Иерархическая кластеризация панели из 36 белков, дифференциально представленной в плазме крови здоровых добровольцев (обозначены зеленым цветом) и пациентов с аденокарциномой легкого (обозначены оранжевым цветом). Для каждого белка рассчитана относительная представленность среди всех участников исследования с помощью процедуры нормализации Z-score. Полученные значения Z-score в относительных единицах представлены в виде тепловой карты

Fig. 1. Potential protein markers of lung adenocarcinoma. Hierarchical clustering of a panel of 36 proteins present in the blood of healthy volunteers (green) and patients with lung adenocarcinoma (orange). Relative abundance among all study participants was calculated using Z-score normalization procedure. The calculated Z-score values in relative units are presented as a heatmap

По результатам ВЭЖХ-МС-анализа в плазме крови были количественно определены 118 белков, являющихся представителями разных функциональных групп. С целью поиска специфических биомаркеров АКЛ мы провели статистический анализ полученных данных и выявили 36 белков, показавших наиболее значимую разницу в представленности между пациентами с АКЛ и здоровыми добровольцами ($p < 0,05$; коэффициент d Коэна $> 0,8$) (табл. 2). Кластерный анализ по профилю представленности данных белков в плазме крови позволяет с довольно высокой эффективностью распределить участников исследования по соответствующим экспериментальным группам (рис. 1).

Для оптимизации панели белков, являющихся специфическими биомаркерами АКЛ, мы применили метод логистической регрессии с L1-регуляризацией (LASSO). Оптимальное значение параметра регуляризации определялось с помощью поиска по сетке (Grid Search) при процедуре кросс-валидации (число фолдов равно 4), проведенной на тренировочной части данных (75 % выборки). Результаты применения алгоритма показали, что более точно пациентов с АКЛ выявляет панель из 12 белков. Мы проконтролировали, чтобы отобранные белки являлись достоверными маркерами АКЛ независимо от клинических параметров, показавших статистически значимые различия между экспериментальными группами, а именно от пола, возраста и курения (рис. 2, а). Разработанная панель белков обеспечивает довольно высокую точность выявления пациентов с АКЛ, что видно при ее анализе с использованием

метода главных компонент (РСА-анализ) (рис. 2, б). Классификатор, построенный на базе этой панели, демонстрирует высокие показатели качества как на тренировочных (75 % выборки) (рис. 2, в), так и на тестовых (25 % выборки) данных (рис. 2, г).

Таким образом, масс-спектрометрический анализ протеома плазмы крови позволил сформировать панель из 12 потенциальных белков-биомаркеров, которые могут довольно эффективно выявлять наличие АКЛ в нашей когорте.

Далее оценена возможность использования масс-спектрометрического анализа протеома плазмы крови для выявления метастатического поражения у пациентов с АКЛ. Для этого мы сравнили белковый профиль плазмы крови пациентов с отдаленными метастазами и без них. Выявлено, что 19 белков демонстрируют статистически значимые ($p < 0,05$; коэффициент d Коэна $> 0,8$) различия между группами, однако после корректировки на множественные сравнения только 1 белок сохраняет достоверность ($q < 0,05$), а 2 демонстрируют различия на уровне тенденции ($q < 0,10$) (табл. 3). Эти белки были включены в дальнейший анализ.

На основании представленности в плазме крови 3 вышеупомянутых белков, а также их различных комбинаций мы сконструировали классификаторы, позволяющие предсказывать наличие отдаленных метастазов у пациентов с АКЛ. В связи с относительно небольшим размером выборки для оценки качества разработанных моделей проведено множественное раз-

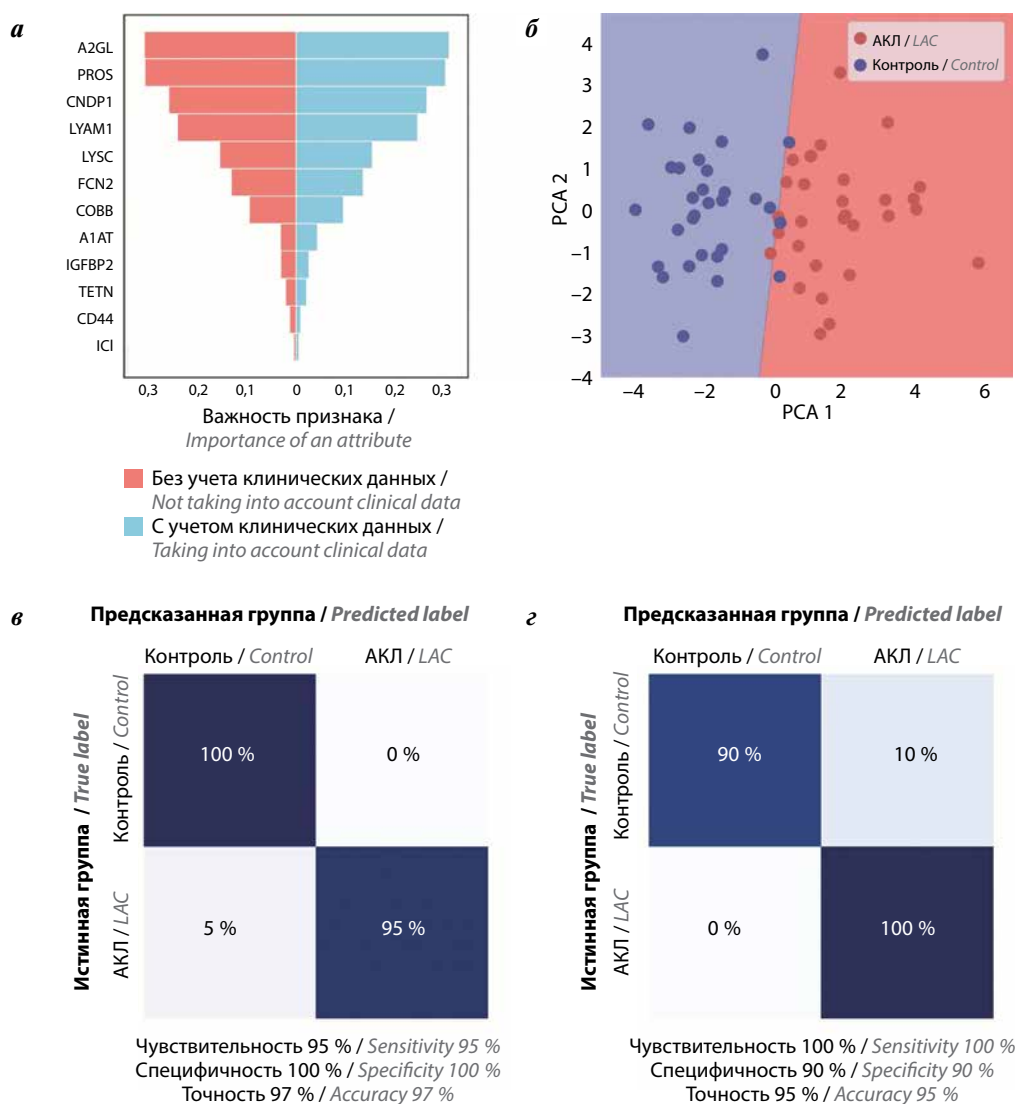


Рис. 2. Характеристики оптимизированной панели белков плазмы крови для выявления пациентов с аденокарциномой легкого (АКЛ): а – влияние клинических данных на коэффициенты математической модели для панели из 12 белков – специфических маркеров АКЛ; б – эффективность разделения участников исследования на экспериментальные группы с помощью разработанной панели белков; в – показатели качества классификатора для выявления пациентов с АКЛ на тренировочных данных (75 % выборки); г – показатели качества классификатора для выявления пациентов с АКЛ на тестовых данных (25 % выборки)

Fig. 2. Characteristics of the optimized serum protein panel for identification of patients with lung adenocarcinoma (LAC): а – effect of clinical data on the mathematical model coefficients for a panel of 12 proteins – LAC specific markers; б – effectiveness of division of the study participants into experimental groups using the developed protein panel; в – quality measures of the classifier for identification of patients with LAC using training data (75 % of the sample); г – quality measures of the classifier for identification of patients with LAC using test data (25 % of the sample)

деление выборки на тренировочные (75 % выборки) и тестовые (25 % выборки) данные, после чего проанализированы метрики разработанных классификаторов (500 итераций для каждого классификатора). Результаты анализа показали, что наиболее точно

выявлять отдаленные метастазы у пациентов с АКЛ позволяет классификатор, учитывающий уровни белков IC1 и НАВР2 в плазме крови (рис. 3). Средние чувствительность и специфичность данного классификатора составляют более 90 % (табл. 4).

Таблица 3. Белки плазмы крови, статистически значимо различающиеся по представленности между пациентами с аденокарциномой легкого с отдаленными метастазами и без них

Table 3. Serum proteins with significantly different abundance in patients with lung adenocarcinoma and distant metastases and without them

Белок Protein	Коэффициент d Коэна Cohen's d	Представленность белка в плазме* Plasma protein abundance*		p	q**
		Наличие метастазов (n = 16) Presence of metastases (n = 16)	Отсутствие метастазов (n = 14) Absence of metastases (n = 14)		
α-1-антитрипсин (A1AT) α-1 antitrypsin (A1AT)	1,19	12,34 (12,22–12,40)	12,56 (12,51–12,77)	1,82 × 10⁻³	9,95 × 10 ⁻²
Гиалуронан-связывающий белок 2 (HABP2) Hyaluronan-binding protein 2 (HABP2)	1,27	3,81 (3,51–3,85)	3,95 (3,85–4,08)	2,55 × 10⁻³	9,94 × 10 ⁻²
Ингибитор протеазы C1 плазмы (IC1) Serum C1 protease inhibitor (IC1)	1,80	7,65 (7,61–7,76)	8,05 (7,91–8,26)	2,33 × 10⁻⁴	2,73 × 10⁻²

*Представленность белков указана в относительных единицах, рассчитанных на основании статистической обработки масс-спектрометрических данных, в виде медианы (межквартильного интервала). **Значение достоверности p с поправкой на множественные сравнения с помощью процедуры Бенджамини–Хохберга.

Примечание. Жирным шрифтом обозначены значения уровней достоверности p и q < 0,05.

*Protein abundance is presented in relative units calculated based on statistical processing of mass spectrometry data as median (interquartile range).

**Significance level p adjusted for multiple comparisons using the Benjamini-Hochberg procedure.

Note. Significance levels p and q < 0.05 are highlighted in bold.

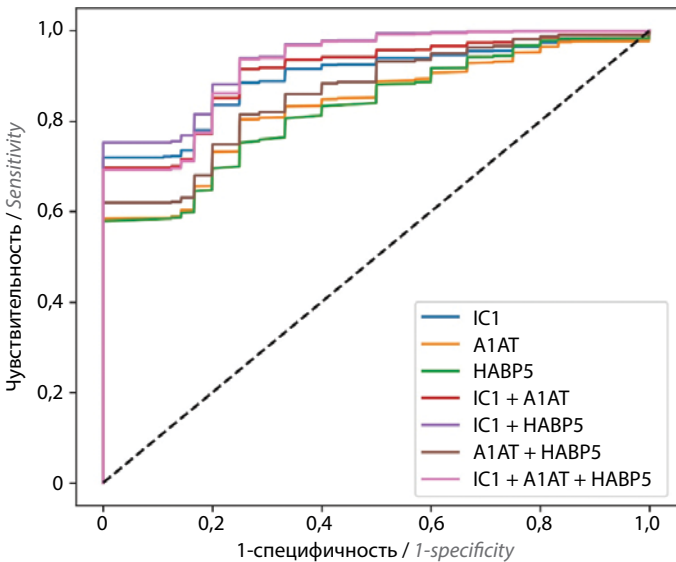


Рис. 3. Сравнение ROC-кривых различных моделей логистических регрессий для выявления метастазов у пациентов с аденокарциномой легкого. Представлены усредненные ROC-кривые для индивидуальных белков и их комбинаций

Fig. 3. Comparison of ROC curves of various logistic regression models for identification of metastases in patients with lung adenocarcinoma. Averaged ROC curves of individual proteins and their combinations are presented

Таблица 4. Характеристики ROC-кривых моделей логистических регрессий для выявления метастазов у пациентов с аденокарциномой легкого на основании протеомики плазмы крови

Table 4. Characteristics of ROC curves of logistic regression models for identification of metastases in patients with lung adenocarcinoma based on plasma protein proteomics

Классификатор Classifier	AUC	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
IC1	0,90 ± 0,10	0,89 ± 0,13	0,91 ± 0,12
A1AT	0,83 ± 0,12	0,82 ± 0,16	0,90 ± 0,13
HABP2	0,83 ± 0,12	0,78 ± 0,20	0,89 ± 0,16
IC1 + A1AT	0,91 ± 0,09	0,93 ± 0,10	0,91 ± 0,11
IC1 + HABP2	0,94 ± 0,07	0,94 ± 0,10	0,91 ± 0,12
A1AT + HABP2	0,86 ± 0,11	0,84 ± 0,17	0,89 ± 0,14
IC1 + A1AT + HABP2	0,92 ± 0,08	0,94 ± 0,10	0,91 ± 0,12

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение для 500 ROC-кривых по каждому классификатору. AUC — площадь под ROC-кривой. Жирным шрифтом выделен классификатор, наиболее эффективно выявляющий наличие отдаленных метастазов у пациентов с аденокарциномой легкого.

Note. Data are presented as mean ± standard deviation for 500 ROC curves for each classifier. AUC — area under ROC curve. Classifier most effectively identifying the presence of distant metastases in patients with lung adenocarcinoma is highlighted in bold.

ОБСУЖДЕНИЕ

Диагностика и лечение ряда заболеваний человека, в том числе онкологических, зачастую сопряжены с инвазивными процедурами, которые имеют серьезные побочные эффекты. Внедрение в клиническую практику современных технологий позволяет осуществлять своевременную раннюю диагностику онкологической патологии, а также проводить подбор персонализированной терапии, тем самым способствуя повышению эффективности терапии и показателей выживаемости пациентов. В этом контексте в последнее время набирает популярность концепция жидкой биопсии, основанная на анализе представленности в крови или других биологических жидкостях специфических онкологических маркеров. Преимуществами данного подхода являются неинвазивность процедуры забора образца и относительно низкая стоимость его анализа по сравнению с такими методами, как иммуногистохимический анализ, компьютерная томография с контрастированием, магнитно-резонансная томография и др. Несмотря на наличие технологий и инструментов для реализации этой концепции, на сегодняшний день ее применение в клинической практике весьма ограничено. В первую очередь это обусловлено отсутствием валидированных биомаркеров онкологических заболеваний. В связи с этим поиск данных биомаркеров является актуальным направлением современных биомедицинских исследований.

В настоящее время РЛ занимает 2-е место по частоте заболеваемости и 1-е место по смертности среди других онкологических патологий. Выделяют 2 подтипа данной

опухоли: немелкоклеточный и мелкоклеточный РЛ. Немелкоклеточный РЛ является наиболее распространенным подтипом: на его долю приходится 80–90 % всех случаев РЛ. Наиболее часто выявляемым гистологическим типом этого рака является АКЛ [16].

В данной работе в рамках концепции жидкой биопсии мы проанализировали представленность широкого спектра белков в плазме крови пациентов с АКЛ и здоровых добровольцев с целью идентификации биомаркеров АКЛ. Для этого мы применили таргетный протеомный анализ с использованием наиболее надежного подхода на базе ВЭЖХ-МС в режиме MRM и набора изотопно-меченных пептидных стандартов для количественного измерения 118 белков плазмы крови. Выбранные белки охватывают широкий спектр потенциальных биомаркеров заболеваний, включая аутоиммунные, сердечно-сосудистые и онкологические патологии [13].

Из проанализированных 118 белков плазмы 36 показали статистически значимое различие в представленности между пациентами с АКЛ и здоровыми донорами. Из них наиболее точно определять наличие АКЛ в исследуемой выборке позволяет панель из 12 белков. Результаты анализа функции выявленных потенциальных биомаркеров АКЛ показали, что примерно 44 % белков принадлежали к системе комплемента или являлись протеазами и их ингибиторами, а остальные относились к белкам межклеточных контактов и адгезии, белкам острой фазы, белкам-транспортерам и др.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, в последнее время активно

исследуется роль системы комплемента в прогрессии злокачественных опухолей. Установлено, что многие опухоли характеризуются активацией системы комплемента, а белки данной системы сильно экспрессируются в опухолевом микроокружении [17, 18]. Результаты ряда работ продемонстрировали вклад протеаз в прогрессию опухолей за счет активации ряда белков, участвующих в ангиогенезе, иммунном ответе и воспалении [19]. Кроме того, для подавляющего большинства белков, которые обнаружены в нашем исследовании как потенциальные маркеры АКЛ, показана ассоциация с развитием и прогрессией ряда опухолей [20–23]. Ассоциация гликопротеина S, зависящего от витамина К (PROS), с онкологическими заболеваниями впервые обнаружена в нашем исследовании. Преимуществом настоящей работы перед аналогичными работами, в которых анализировались индивидуальные белки или белки одной функциональной группы, является то, что в ней оценена представленность в плазме крови свыше 100 белков, обладающих разными функциями. Как следствие, итоговая панель, состоящая из 12 белков, предложенная нами в качестве специфического белкового профиля АКЛ, включает белки разных функциональных групп, что отражает комплексное влияние опухоли на различные физиологические процессы организма. Сочетание разных белков в рамках одной панели позволяет не только достичь высоких показателей чувствительности и специфичности, но и способствует большей устойчивости панели к естественным флуктуациям в представленности белков в популяции [13].

С помощью реализованного в рамках данного исследования подхода, помимо специфического белкового профиля АКЛ, мы также обнаружили маркеры наличия отдаленных метастазов у пациентов с данной опухолью. Как нами было показано, пациенты с отдаленными метастазами в легких, печени, костях и мозге характеризуются повышенными уровнями в плазме крови α -1-антитрипсина (A1AT), гиалуронан-связывающего белка 2 (HABP2) и ингибитора протеазы C1 плазмы (IC1). Примечательно, что все 3 белка принадлежат к одной функциональной группе: HABP2 является сериновой протеазой, в то время как A1AT и IC1 — ингибиторами различных протеаз, в том числе сериновых. Ранее потенциальная вовлеченность данных белков в формирование и прогрессию онкологических заболеваний продемонстрирована результатами ряда работ. Так, с использованием линий клеток человека и мышиных моделей АКЛ показано, что протеаза HABP2 является важным регулятором прогрессирования опухоли, в 2 раза ускоряя ее рост и на порядок повышая метастатический потенциал [24]. Кроме того, обнаружено, что белок A1AT способствует выживанию

клеток немелкоклеточного РЛ и увеличивает их резистентность *in vitro* [25]. Повышение уровня IC1 в сыворотке крови ранее выявлено у пациентов с немелкоклеточным РЛ [26].

Таким образом, полученные нами данные согласуются с результатами других работ и демонстрируют, что информация относительно белков HABP2 и A1AT, полученная *in vitro* и/или *in vivo* на грызунах, может быть верной и для человека, а белок IC1 не только является биомаркером РЛ, но и, возможно, вовлечен в метастазирование. В совокупности эти сведения указывают на значительную роль протеаз и их ингибиторов как в прогрессии опухоли, так и в формировании отдаленных метастазов, что, с одной стороны, позволяет рассматривать их как потенциальные диагностические и прогностические маркеры, а с другой — как терапевтические мишени. Однако эти вопросы требуют дополнительных исследований на независимых выборках.

Настоящее исследование обладает рядом ограничений. В первую очередь, нужно оговориться, что в рамках нашего исследования не проанализированы генетические характеристики опухолей, в частности статусы TP53 и TTF-1. Кроме того, ограничением исследования является тот факт, что данные масс-спектрометрического анализа представленности белков в плазме крови получены в относительных единицах, а не в абсолютных концентрациях. Для пересчета необходимо подробно охарактеризовать SIS, что мы планируем осуществить в дальнейшем. Наконец, как уже упоминалось ранее, работа выполнена на относительно небольшой выборке. Для уточнения качества созданных классификаторов для выявления АКЛ и наличия отдаленных метастазов необходимо проанализировать данные большего числа пациентов. Тем не менее полученные данные и уровни их статистической значимости позволяют предположить, что обнаруженные закономерности довольно ярко выражены и потому могут быть выявлены даже на относительно небольшой выборке образцов и сохранять актуальность в других когортах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные сравнительного протеомного анализа плазмы крови пациентов с АКЛ и здоровых добровольцев позволяют выявить биомаркеры этой патологии. Мы предложили использовать панель из 12 белков, представляющих собой специфический белковый профиль АКЛ, а также панель из 3 белков, являющихся маркерами отдаленных метастазов. Однако применимость данных белковых панелей в клинической практике для скрининга АКЛ и прогнозирования исходов заболевания требует валидации на расширенных выборках пациентов и здоровых доноров.

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

1. Thandra K.C., Barsouk A., Saginala K. et al. Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2021;25(1):45–52. DOI: 10.5114/wo.2021.103829
2. Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 2024;74(1):12–49. DOI: 10.3322/caac.21820
3. Юркова Ю.П., Мерабишвили В.М., Левченко Е.В. Эпидемиология и выживаемость больных раком легкого, влияние COVID-19 (клинико-популяционное исследование). *Вопросы онкологии* 2022;68(5):576–88. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-576-588
Yurkova Yu.P., Merabishvili V.M., Levchenko E.V. Epidemiology and survival of lung cancer patients, the impact of COVID-19 (clinical and population-based study). *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2022;68(5):576–88. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-576-588
4. Hammer M.M., Byrne S.C., Kong C.Y. Factors influencing the false positive rate in CT lung cancer screening. *Acad Radiol* 2022;29(Suppl 2):S18–22. DOI: 10.1016/j.acra.2020.07.040
5. Dai X., Shen L. Advances and trends in omics technology development. *Front Med (Lausanne)* 2022;9:911861. DOI: 10.3389/fmed.2022.911861
6. Baietto L., D'Avolio A., Ventimiglia G. et al. Development, validation, and routine application of a high-performance liquid chromatography method coupled with a single mass detector for quantification of itraconazole, voriconazole, and posaconazole in human plasma. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(8):3408–13. DOI: 10.1128/AAC.01807-09
7. Van Der Gugten J.G., Wong S., Holmes D.T. Quantitation of insulin analogues in serum using immunoaffinity extraction, liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2016;1378:119–30. DOI: 10.1007/978-1-4939-3182-8_14
8. Sepiashvili L., Kohlhagen M.C., Snyder M.R. et al. Direct detection of monoclonal free light chains in serum by use of immunoenrichment-coupled MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem* 2019;65(8):1015–22. DOI: 10.1373/clinchem.2018.299461
9. Jeong J.S., Kim S.K., Park S.R. Amino acid analysis of dried blood spots for diagnosis of phenylketonuria using capillary electrophoresis-mass spectrometry equipped with a sheathless electrospray ionization interface. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(25):8063–72. DOI: 10.1007/s00216-013-6999-6
10. Banerjee S. Empowering clinical diagnostics with mass spectrometry. *ACS Omega* 2020;5(5):2041–8. DOI: 10.1021/acsomega.9b03764
11. Lianidou E., Pantel K. Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer* 2019;58(4):219–32. DOI: 10.1002/gcc.22695
12. Heidrich I., Ackar L., Mossahebi Mohammadi P. et al. Liquid biopsies: potential and challenges. *Int J Cancer* 2021;148(3):528–45. DOI: 10.1002/ijc.33217
13. Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Brzhozovskiy A.G. et al. Absolute quantitative targeted monitoring of potential plasma protein biomarkers: a pilot study on healthy individuals. *Biomedicines* 2024;12(10):2403. DOI: 10.3390/biomedicines12102403
14. De Groot P., Munden R.F. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am* 2012;50(5):863–76. DOI: 10.1016/j.rcl.2012.06.006
15. Hoofnagle A.N., Becker J.O., Oda M.N. et al. Multiple-reaction monitoring-mass spectrometric assays can accurately measure the relative protein abundance in complex mixtures. *Clin Chem* 2012;58(4):777–81. DOI: 10.1373/clinchem.2011.173856
16. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492
17. Revel M., Daugan M.V., Sautes-Fridman C. et al. Complement system: promoter or suppressor of cancer progression? *Antibodies (Basel)* 2020;9(4). DOI: 10.3390/antib9040057
18. Kolev M., Das M., Gerber M. et al. Inside-out of complement in cancer. *Front Immunol* 2022;13:931273. DOI: 10.3389/fimmu.2022.931273
19. Radisky E.S. Extracellular proteolysis in cancer: proteases, substrates, and mechanisms in tumor progression and metastasis. *J Biol Chem* 2024;300(6):107347. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.107347
20. Yamamoto M., Takahashi T., Serada S. et al. Overexpression of leucine-rich alpha2-glycoprotein-1 is a prognostic marker and enhances tumor migration in gastric cancer. *Cancer Sci* 2017;108(10):2052–60. DOI: 10.1111/cas.13329
21. Shinozaki E., Tanabe K., Akiyoshi T. et al. Serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 with fucosylated triantennary N-glycan: a novel colorectal cancer marker. *BMC Cancer* 2018;18(1):406. DOI: 10.1186/s12885-018-4252-6
22. Wei L.F., Weng X.F., Huang X.C. et al. IGFBP2 in cancer: pathological role and clinical significance (Review). *Oncol Rep* 2021;45(2):427–38. DOI: 10.3892/or.2020.7892
23. Arellano-Garcia M.E., Li R., Liu X. et al. Identification of tetranectin as a potential biomarker for metastatic oral cancer. *Int J Mol Sci* 2010;11(9):3106–21. DOI: 10.3390/ijms11093106
24. Mirzapozazova T., Mambetsariev N., Lennon F.E. et al. HAP2 is a novel regulator of hyaluronan-mediated human lung cancer progression. *Front Oncol* 2015;5:164. DOI: 10.3389/fonc.2015.00164
25. Janciauskiene S., Wrenger S., Gunzel S. et al. Potential roles of acute phase proteins in cancer: why do cancer cells produce or take up exogenous acute phase protein alpha1-antitrypsin? *Front Oncol* 2021;11:622076. DOI: 10.3389/fonc.2021.622076
26. Zeng X., Hood B.L., Zhao T. et al. Lung cancer serum biomarker discovery using label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Thorac Oncol* 2011;6(4):725–34. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31820c312e

Вклад авторов

Д.Н. Коробков: включение в исследование пациентов с аденокарциномой легкого, сбор клинических данных, написание текста статьи, редактирование;

А.С. Кононихин: проведение инструментальных исследований, анализ и систематизация экспериментальных данных, написание текста статьи, редактирование;

С.Д. Семенов: анализ и систематизация экспериментальных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи, редактирование;

Е.Л. Кордзая: включение в исследование здоровых добровольцев, сбор клинических данных;

А.Г. Бржозовский: анализ и статистическая обработка экспериментальных данных масс-спектрометрического анализа;

А.Е. Бугрова: проведение инструментальных исследований, анализ и систематизация экспериментальных данных;

Е.Ю. Васильева, Д.Ю. Каннер, Е.Н. Николаев: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, редактирование;

А.А. Комиссаров: разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация результатов исследования, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

D.N. Korobkov: inclusion of patients with lung adenocarcinoma in the study, collection of clinical data, article writing, editing;
A.S. Kononikhin: conducting instrumental research, analyzing and systematizing experimental data, article writing, editing;
S.D. Semenov: analysis and systematization of experimental data, statistical data processing, article writing, editing;
E.L. Kordzaya: inclusion of healthy volunteers in the study, collection of clinical data;
A.G. Brzhozovsky: analysis and statistical processing of experimental mass spectrometric analysis data;
A.E. Bugrova: instrumental research, analysis and systematization of experimental data;
E.Yu. Vasilyeva, D.Yu. Kanner, E.N. Nikolaev: development of the concept and design of the study, article writing, editing;
A.A. Komissarov: development of the research concept and design, interpretation of the research results, text writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.C. Кононихин / A.S. Kononikhin: <https://orcid.org/0000-0002-2238-3458>
Е.Л. Кордзая / E.L. Kordzaya: <https://orcid.org/0000-0001-9146-7463>
Е.Ю. Васильева / E.Yu. Vasilyeva: <https://orcid.org/0000-0003-4111-0874>
Д.Ю. Каннер / D.Yu. Kanner: <https://orcid.org/0000-0002-0649-6452>
Е.Н. Николаев / E.N. Nikolaev: <https://orcid.org/0000-0001-6209-2068>
А.А. Комиссаров / A.A. Komissarov: <https://orcid.org/0000-0003-1018-5195>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование поддержано грантом Правительства Москвы на реализацию научно-практического проекта в медицине (проект № 2312-29/22).

Funding. This study was sponsored by the Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare (project No. 2312/29-22).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено Московским городским независимым этическим комитетом (протокол № 124 от 16.05.2023). Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266.

Пациенты и здоровые доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was approved by the Moscow City Independent Ethics Committee (Protocol No. 124 dated 16.05.2023). The study was carried out in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association "Ethical principles of scientific medical research involving humans" as amended in 2000 and the "Rules of clinical practice in the Russian Federation", approved by Order of the Ministry of Health of Russia dated 16.05.2023 No. 266.

The patients and healthy donors signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 17.12.2024. **Принята к публикации:** 27.02.2025. **Опубликована онлайн:** 05.04.2025.

Article submitted: 17.12.2024. **Accepted for publication:** 27.02.2025. **Published online:** 05.04.2025.

Памяти академика Михаила Ивановича Давыдова

11.10.1947–08.02.2025



8 февраля 2025 г. ушел из жизни Михаил Иванович Давыдов — выдающийся хирург-онколог, один из основоположников российской онкологической школы, заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик Российской академии медицинских наук и Российской академии наук, врач и ученый с мировым именем, возглавлявший Российский онкологический центр им. Н.Н. Блохина с 2001 по 2017 г. Михаил Иванович посвятил всю жизнь борьбе с онкологическими заболеваниями, развитию центра, созданию новых технологий в онкологии и спасению жизней пациентов.

Трудно переоценить вклад М.И. Давыдова в развитие отечественной онкологии и мировой

онкохирургии. Он был главным внештатным онкологом Минздрава России, главным онкологом медицинского центра Управления делами Президента России, членом Европейского и Американского обществ хирургов, Международного общества хирургов, Нью-Йоркской академии наук и, по оценкам международных экспертов, одним из наиболее авторитетных в мире онкохирургов. Несмотря на огромную административную нагрузку в онкологическом центре и активную общественную работу по развитию онкологической помощи в регионах России, Михаил Иванович всегда был оперирующим хирургом и именно эту работу считал главным делом своей жизни.

Михаил Иванович родился 11 октября 1947 г. в г. Конотопе Сумской области УССР. После школы окончил Суворовское училище, а затем Ейское летное училище. Службу в армии прошел в воздушно-десантных войсках, профессионально занимался спортом, получил диплом мастера спорта международного класса по боксу. После окончания срочной службы М.И. Давыдов поступил в Первый Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова, после его окончания в 1975 г. — в ординатуру, а затем — в аспирантуру Всесоюзного онкологического научного центра. В 1988 г. Михаил Иванович стал заведующим торакальным отделением Института клинической онкологии, который впоследствии возглавил, а в 2001 г. был единогласно избран директором Онкологического центра им. Н.Н. Блохина.

Еще в годы обучения в аспирантуре Михаил Иванович проявил характер, во многом определивший его последующую судьбу, — высокие амбиции, бойцовские качества, бесстрашие, азарт и готовность бросить вызов смертельному диагнозу. Уже тогда он брался за самые безнадежные случаи — в нарушение стандартов и протоколов он оперировал «неоперабельных» пациентов, спасая тех, кого спасти считалось уже невозможным.

Этому принципу М.И. Давыдов следовал всю свою жизнь, совершенствуя существующие методы хирургического лечения пациентов с опухолями легкого, пищевода,

почки, желудка и средостения и создавая новые оригинальные технологии. Он разработал принципиально новые методики по удалению опухолевых тромбозов сердца и нижней полой вены при раке почки, что сделало Онкологический центр им. Н.Н. Блохина мировым лидером в данном направлении, создал оригинальную технологию внутриплевральных и внутрибрюшных пищеводных анастомозов. М.И. Давыдов первым в онкогигирургии начал проводить сложнейшие операции с пластикой и протезированием полых вен, легочных артерий и аорты. Совместно с академиком Ренатом Акчуриным он заложил основы кардиохирургии и трансплантологии у онкологических пациентов, существенно расширив возможности лечения рака. За свою клиническую практику М.И. Давыдов выполнил более 20 000 уникальных операций. Его хирургическая техника была настолько виртуозной и неповторимой, что даже в научной среде считалась «волшебной», а его операции — искусством. К Михаилу Ивановичу съезжались больные со всех уголков России, в том числе с самыми тяжелыми формами болезни, с диагнозами, которые по современным представлениям уже не оставляли возможностей хирургического лечения. Помочь таким пациентам он считал делом чести, проверкой на профессионализм. Самым главным для профессионала-хирурга он считал не останавливаться на достигнутом, постоянно повы-

шать планку, брать новые рубежи и бросать новые вызовы природе.

В период с 2006 по 2011 г. Михаил Иванович возглавлял Российскую академию медицинских наук и инициировал ряд проектов, направленных на повышение эффективности медицинской помощи в российском здравоохранении, в том числе на построение системы онкологической службы, а также на решение социально-экономических вопросов. Именно М.И. Давыдову принадлежит идея создания программы Национальной стратегии по борьбе с онкологическими заболеваниями.

Многолетняя плодотворная научная, клиническая и организационная работа Михаила Ивановича, его огромный вклад в российскую медицинскую науку отмечены высокими наградами. Ему присвоено звание заслуженного деятеля науки России, он является лауреатом Государственной премии в области науки и техники, премии им. Т.И. Ерошевского за лучшую работу в области медицинской геронтологии и гериатрии, премии «Триумф-наука» в области наук о жизни и медицины, премии Правительства России в области науки и техники, премии им. А.Н. Бакулева «За выдающиеся достижения в онкологии и новаторские работы в лечении интерактивной патологии», международной премии «Профессия — жизнь» в номинации «За выдающийся вклад в развитие клинической медицины в области онкологии», российской премии

Людвига Нобеля. М.И. Давыдов награжден орденом «За заслуги перед Отечеством» IV степени, орденом Почета, орденом «За заслуги перед Республикой Башкортостан», орденом Украины «За заслуги» III степени, орденом «За честь, доблесть, соиздание, милосердие», орденом «Звезда экономики России», золотой медалью им. А.Н. Бакулева, золотой медалью академика Б.В. Петровского «Выдающемуся хирургу мира».

Необыкновенный масштаб личности, мощная харизма, бескомпромиссность, высокие требования к себе и сотрудникам онкологического центра в сочетании с высочайшим профессионализмом сделали Михаила Ивановича Давыдова безусловным лидером отечественной онкологии, пользующимся огромным авторитетом в стране и мире.

М.И. Давыдов внес огромный вклад в формирование и развитие российской школы онкохирургии. Его ученики, среди которых академики, профессора, доктора и кандидаты наук, высококвалифицированные врачи-онкологи, а также коллеги, работающие в области клинической и экспериментальной онкологии, гордятся тем, что им довелось работать с Михаилом Ивановичем. Все они будут с огромным уважением хранить память о выдающемся ученом, онкологе, учителе и руководителе, а тысячи пациентов — с благодарностью и любовью вспоминать великого хирурга, спасшего жизни близких.