

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

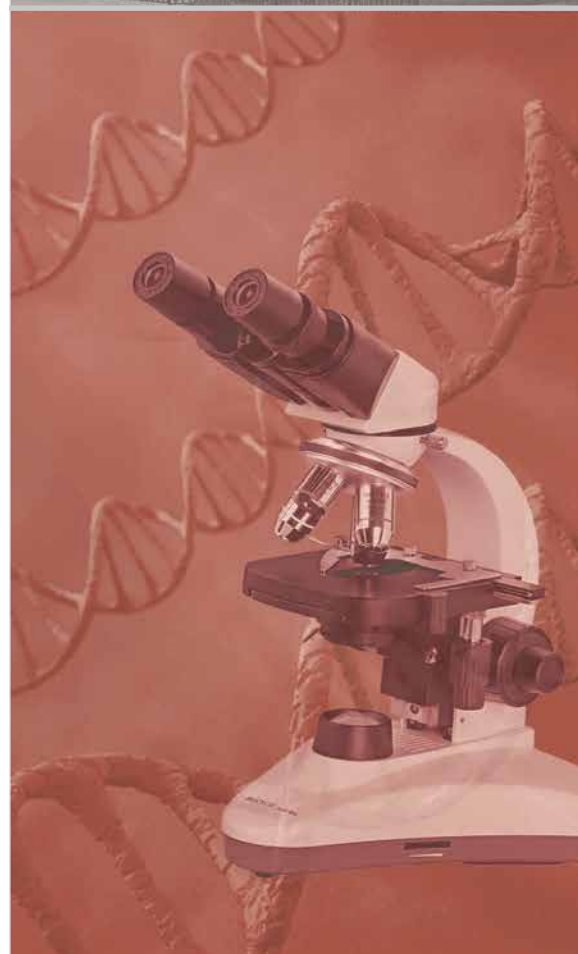
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*Иммунотерапия злокачественных глиом:
современное состояние проблемы*

*Ингибитор HSP90: влияние на рецептор
эстрогенов α в клетках рака молочной
железы*

*Экспрессия генов-регуляторов апоптоза
и развитие химиорезистентности
сарком мягких тканей*

*Экспрессия длинных некодирующих РНК
при раке пищевода*

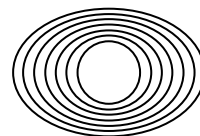


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную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

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

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

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

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

4 **ТОМ 11**
'24

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 **Р.В. Журавлева**

Дизайн **Е.В. Степанова**

Верстка **Е.В. Степанова**

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, 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.
2024. Том 11. № 4. 1–128.

© Оформление, верстка.
ООО «ИД «АБВ-пресс», 2024

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.м.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 рентгенодиагностики» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

Кжышковская 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)

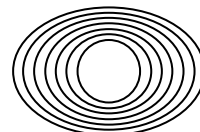
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

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

4 VOL. 11
'24

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 R.V. Zhuravleva

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
(PII 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.
2024. Vol. 11 No. 4. 1–128.

© Design, layout PH "ABV-Press",
2024
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 University 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)

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

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

Mazurenko, Natalia N., DSc, PhD, Professor, 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, келья 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

- М.Г. Якубовская, Т.И. Фетисов, Л.Г. Соленова, Н.И. Рыжова, А.В. Лохонина, И.А. Антонова, Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, В.В. Агинова*
Механистические и эпидемиологические данные о роли микробиоты и вирома в канцерогенезе 8
- А.А. Пичугин, Р.Р. Ковязина, А.А. Трондин, А.Г. Алексеев, П.Б. Копнин, Т.В. Гессель, С.В. Бойчук*
Иммунотерапия злокачественных глиом: современное состояние проблемы 23
- Т.Г. Ружа, М.Н. Курбат, Н.В. Палкина, В.А. Куценко*
Роль нарушения цикла метионина в инициации и прогрессии злокачественных опухолей 41

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.М. Щербаков, Д.В. Сорокин, Д.И. Сальникова, М.В. Гудкова, О.Е. Андреева, А.Л. Михайлова, А.О. Воробьева, Ю.А. Пивень*
Влияние нового ингибитора HSP90 на сигнальные пути рецептора эстрогенов α в клетках рака молочной железы. 54
- В.Г. Попова, Е.С. Лылова, А.Ю. Букина, К.А. Зимин, М.К. Хирин, Е.М. Жидкова, Е.С. Трапезникова, М.Г. Якубовская, В.П. Максимова, К.И. Кирсанов*
Молекулярные механизмы действия кураксина CBL0137 на клетки рака молочной железы *in vitro* 66
- Т.И. Фетисов, С.А. Хазанова, П.А. Штомпель, Е.С. Трапезникова, А.А. Тарарыкова, В.Ю. Зиновьева, В.И. Маршалл, А.А. Ловенгер, И.С. Купаева, Д.В. Рогожин, А.Ю. Бохян, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов*
Изменения экспрессии генов-регуляторов апоптоза как фактор развития химиорезистентности сарком мягких тканей. 80
- О. V. Kovaleva, P. A. Podlesnaya, E. S. Kudinova, M. A. Rashidova, V. V. Mochalnikova, A. N. Gratchev*
Clinical significance of long non-coding RNA expression in esophageal cancer depending on the phenotype of the tumor stroma. 93
- М.В. Беркут, А.С. Артемьева, А.В. Хохлова, А.Э. Саад, А.К. Носов*
Роль иммуногистохимического исследования в определении молекулярного подтипа рака мочевого пузыря 102
- В.С. Скрипова, Д.А. Фирсова, А.В. Килунов, Л.Ф. Булатова, М.А. Попутский, Р.Г. Киямова*
Создание *in vitro* модели для изучения роли дисульфидных связей в составе большого внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках карциномы яичника OVCAR-8 114

REVIEWS

- M.G. Yakubovskaya, T.I. Fetisov, L.G. Solenova, N.I. Ryzhova, A.V. Lokhonina, I.A. Antonova, G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, V.V. Aginova*
Mechanistic and epidemiological evidence on the relationship between microbiota, virome and carcinogenesis8
- A.A. Pichugin, R.R. Kovyazina, A. Trondin, A.G. Alekseev, P. B. Kopnin, T.V. Gessel, S.V. Boichuk*
Immunotherapy of malignant gliomas: a modern view on the problem23
- T.G. Ruksha, M.N. Kurbat, N.V. Palkina, V.A. Kutsenko*
The role of methionine cycle disruption in the initiation and progression of malignant tumors41

EXPERIMENTAL REPORTS

- A.M. Scherbakov, D.V. Sorokin, D.I. Salnikova, M.V. Gudkova, O.E. Andreeva, A.L. Mikhaylova, N.A. Varabyeva, Yu.A. Piven*
Effects of a novel HSP90 inhibitor on estrogen receptor α signaling pathways in breast cancer cells54
- V.G. Popova, E.S. Lylova, A.Yu. Bukina, K.A. Zimin, M.K. Khirin, E.M. Zhidkova, E.S. Trapeznikova, M.G. Yakubovskaya, V.P. Maksimova, K.I. Kirsanov*
Molecular mechanisms of action of curaxin CBL0137 on breast cancer cells *in vitro*66
- T.I. Fetisov, S.A. Khazanova, P.A. Shtompel, E.S. Trapeznikova, A.A. Tararykova, V.Yu. Zinovyeva, V.I. Marshall, A.A. Lowenger, I.S. Kupaeva, D.V. Rogozhin, A.Yu. Bokhyan, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov*
Changes in the expression of genes that regulate apoptosis as a factor in the development of chemoresistance in soft tissue sarcoma80
- O.V. Kovaleva, P.A. Podlesnaya, E.S. Kudinova, M.A. Rashidova, V.V. Mochalnikova, A.N. Gratchev*
Клиническая значимость экспрессии длинных некодирующих РНК при раке пищевода в зависимости от фенотипа опухолевой стромы93
- M.V. Berkut, A.S. Artemyeva, A.V. Khokhlova, A.I. Saad, A.K. Nosov*
The role of immunohistochemical analysis in determining the molecular subtypes of bladder cancer102
- V.S. Skripova, D.A. Firsova, A.V. Kilunov, L.F. Bulatova, M.A. Poputsky, R.G. Kiyamova*
Development of an *in vitro* model to study the role of disulfide bonds in the largest extracellular domain of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b in OVCAR-8 ovarian carcinoma cells114

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-8-22>

Механистические и эпидемиологические данные о роли микробиоты и вирома в канцерогенезе

М.Г. Якубовская^{1,2}, Т.И. Фетисов^{1,2}, Л.Г. Соленова¹, Н.И. Рыжова¹, А.В. Лохонина², И.А. Антонова¹, Г.А. Белицкий¹, К.И. Кирсанов^{1,2}, В.В. Агинова¹

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

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

Контакты: Марианна Геннадиевна Якубовская myakubovskaya@mail.ru, Виктория Викторовна Агинова v.aginova@ronc.ru

Развитие молекулярных и генетических технологий позволило на молекулярном уровне продемонстрировать ко-эволюционные принципы взаимодействия микробиоты, вирома и организма-хозяина, а также роль микроорганизмов и вирусов в поддержании физиологического гомеостаза и развитии различных заболеваний, включая злокачественные новообразования. Представленный обзор посвящен анализу и обобщению современных данных о микроорганизмах и вирусах, населяющих человеческий организм, а также их роли в процессах инициации, промоции и прогрессии канцерогенеза. В статье приведена информация об известных онкогенных вирусах и микроорганизмах с учетом современной классификации канцерогенных агентов Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer). Рассмотрены механистические данные о проканцерогенном воздействии микробиоты и вирома в соответствии с современной концепцией ключевых характеристик канцерогенного агента. Особое внимание уделено анализу данных о влиянии микробиоты и вирома на иммунитет организма-хозяина, включая первые результаты иммунотерапии токсинном Коли сарком мягких тканей и остеосарком, а также о воздействии отдельных видов микроорганизмов на формирование профиля зрелых иммунокомпетентных клеток организма-хозяина. Кроме того, представлены сведения о влиянии внутриопухолевой и внутриклеточной микробиоты на микроокружение опухолевых клеток и клеточный сигналинг, в том числе в солидных опухолях, не имеющих контакта с внешней средой. Приведенные данные важны в плане использования концепции холобиота, т. е. взаимозависимого существования организма человека, микроорганизмов и вирусов, для совершенствования профилактики и терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: микробиота, вирус, дисбиоз, злокачественное новообразование, канцерогенная опасность, ключевая характеристика канцерогенного агента, противоопухолевый иммунитет, микроокружение опухоли

Для цитирования: Якубовская М.Г., Фетисов Т.И., Соленова Л.Г. и др. Механистические и эпидемиологические данные о роли микробиоты и вирома в канцерогенезе. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):8–22.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-8-22>

Mechanistic and epidemiological evidence on the relationship between microbiota, virome and carcinogenesis

M.G. Yakubovskaya^{1,2}, T.I. Fetisov^{1,2}, L.G. Solenova¹, N.I. Ryzhova¹, A.V. Lokhonina², I.A. Antonova¹, G.A. Belitsky¹, K.I. Kirsanov^{1,2}, V.V. Aginova¹

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

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Marianna Gennadievna Yakubovskaya myakubovskaya@mail.ru, Viktoriya Viktorovna Aginova v.aginova@ronc.ru

Recent development of molecular and genetic technologies has demonstrated at the molecular level the co-evolutionary principles of interaction between microbiota, virome and the host organism, as well as the role of microorganisms and viruses both in maintaining physiological homeostasis and in the development of various diseases, including malignant neoplasms. The presented review is devoted to the analysis and generalization of modern data on microorganisms and viruses inhabiting the human body, their role in the processes of initiation, promotion and progression of carcinogenesis. The review provides information on known oncogenic viruses and microorganisms according to the modern classification of carcinogenic agents of the International Agency for Research on Cancer. Mechanistic

data on the procarcinogenic effect of microbiota and virome are considered in accordance with the modern concept of key characteristics of a carcinogenic agent. Particular attention is paid to the analysis of data on the influence of microbiota and virome on the immunity of the host organism, including both the first results of immunotherapy with Coley toxin of soft tissue sarcomas and osteosarcomas, and data on the influence of individual types of microorganisms on the formation of the immunocompetent cell profile of the host organism. In addition, the influence of intratumor and intracellular microbiota, respectively, on the microenvironment of tumor cells and cellular signaling, including in solid tumors that have no contact with the external environment are also discussed. The data presented are important in terms of the holobiota concept, showing the interdependent existence of the human body, microorganisms and viruses, to improve the prevention and therapy of malignant neoplasms.

Keywords: microbiota, virome, dysbiosis, malignant neoplasm, carcinogenic hazard, key characteristic of a carcinogenic agent, antitumor immunity, tumor microenvironment

For citation: Yakubovskaya M.G., Fetisov T.I., Solenova L.G. et al. Mechanistic and epidemiological evidence on the relationship between microbiota, virome and carcinogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):8–22. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-8-22>

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования роли микробиоты и вирома человека в канцерогенезе неразрывно связаны с изменениями, произошедшими в последние десятилетия в микробиологии и иммунологии. Микроорганизмы, впервые описанные Антони ван Левенгуком после определения Робертом Кохом трех обязательных условий, доказывающих инфекционную природу заболевания, ученые изучали с использованием чистых культур [1]. В конце XX века стало очевидным, что поведение микроорганизмов в чистых культурах не соответствует закономерностям их существования в виде компонентов динамичных сообществ микроорганизмов и вирусов, находящихся под влиянием факторов микроокружения определенных ниш организма-хозяина [2].

За последние три десятилетия произошла революция в понимании взаимодействия организма-хозяина, микроорганизмов и вирусов, что привело к формированию концепции холобионта, согласно которой организм человека рассматривается в совокупности со своими симбионтами, т. е. сосуществующими с ним живыми микроорганизмами и вирусами. Основанием для этого стала смена двух парадигм: по функционированию системы распознавания «свой – чужой» и по многообразию/обилию микроорганизмов и вирусов, заселяющих различные ниши организма человека. Так, были открыты молекулярные механизмы функционирования иммунитета с помощью образ-распознающих рецепторов (pattern recognition receptors, PRR) [3, 4]. Концепция взаимодействия физиологически активных веществ со специфическими рецепторами была сформулирована Паулем Эрлихом; в настоящее время известны более 400 PRR для различных молекулярных структур [5, 6].

Менее чем через 10 лет после открытия Toll-рецепторов благодаря внедрению технологий метагеномного анализа и секвенирования продуктов амплификации 16S/18S/ITS, а также полногеномного секвенирования получена детальная информация о геномах микроорганизмов и вирусов в различных нишах

организма-хозяина, так называемом микробиоме человека. Следует отметить, что микробиологи однозначно не относят к микробиоте вирусы. Некоторые исследователи включают их в состав микробиома [1]. На основании анализа микробиомов сделан вывод, что большую часть микробиоты человека составляют бактерии, которые представлены более чем 3000 видов. Общая численность бактерий приблизительно соответствует количеству клеток взрослого организма человека и составляет от 10^{13} до 10^{14} КОЕ [7]. Большая часть микробиоты (97 %) представлена бактериями, населяющими толстую кишку, 2–3 % – бактериями, населяющими другие области организма человека (другие отделы желудочно-кишечного тракта, кожу, органы дыхательной и мочеполовой систем), и, наконец, от 0,1 до 1 % – простейшими, микроскопическими грибами и археями [7, 8]. Данные метагеномных анализов демонстрируют, что только в кишечнике насчитывается более 54 тыс. видов вирусов, 10–25% из которых – это эукариотические вирусы; остальную часть составляют вирусы бактерий, т. е. бактериофаги [7, 9].

Организм человека является средой обитания и источником пищи для микроорганизмов, которые могут по-разному участвовать в процессах метаболизма организма-хозяина, не только влияя на поступление пищевых компонентов, уровень активности врожденного и формирование приобретенного иммунитета, но и продуцируя биологически активные и токсические соединения, изменяющие характеристики клеток организма-хозяина и определяющие распространение патогенных микроорганизмов. Большинство представителей микробиоты здорового человека следует отнести к мутуалистам, приносящим очевидную пользу организму-хозяина в поддержании гомеостаза, и комменсалам, которые лишь используют организм-хозяина как среду обитания и источник питательных веществ, не оказывая на него какого-либо влияния [1]. В организме здорового человека может присутствовать небольшая доля условно-патогенных микроорганизмов, т. е. проявляющих свое патогенное действие лишь при

определенных условиях [10]. В то же время между отдельными микроорганизмами и вирусами, заселяющими организм человека, могут существовать всевозможные виды симбиоза [1].

Более 90 % бактерий микробиоты относятся к 2 основным типам — *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Менее представлены в микробиоте типы *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Пропорции каждого из этих типов бактерий у большинства людей весьма схожи, однако видовой состав микробиоты индивидуален и зависит от возраста, пола, диеты, образа жизни, наличия заболеваний и пр. [8, 11]. Обеднение видового состава микробиоты, уменьшение количества факультативно-анаэробных, аэротолерантных и облигатных анаэробных микроорганизмов, появление или увеличение количества условно-патогенных штаммов получило название дисбиоза. К настоящему времени получены эпидемиологические данные об ассоциации дисбиоза с патогенезом различных заболеваний. Объем научной литературы, посвященной взаимосвязи особенностей микробиоты человека с риском развития злокачественных новообразований (ЗНО), весьма обширен и в последние годы неуклонно увеличивается. Идентифицированы специфические виды бактерий и вирусов, присутствие которых в организме человека выявлено при раке желудка, легкого, поджелудочной железы, полости рта, лимфомах различной этиологии, колоректальном раке, гепатоцеллюлярной карциноме [12–14]. Интересны результаты метагеномного анализа образцов опухолевой ткани, не имеющих прямого контакта с внешней средой. Бактериальная ДНК была обнаружена в остеосаркомах и саркомах мягких тканей, а также метастазах во внутренние органы меланомы, аденокарциномы молочной и поджелудочной желез [15].

Целью представленного обзора является анализ большого количества опубликованных данных современных эпидемиологических и экспериментальных исследований, посвященных анализу влияния микробиоты и вирусов на процессы канцерогенеза.

КАНЦЕРОГЕНООПАСНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И ВИРУСЫ ЧЕЛОВЕКА

Международное агентство по изучению рака (МАИР) (International Agency for Research on Cancer, IARC) разработало унифицированный подход для определения канцерогеноопасных агентов на основании эпидемиологических исследований, экспериментов на животных и механистических данных, полученных в разных экспериментальных системах *in vitro*. В 2018 г. МАИР сформулировало новую концепцию ключевых характеристик канцерогенного агента, на основании которой в настоящее время проводится более системная оценка механистических данных по проканцерогенному эффекту рассматриваемого агента [16]. Согласно этой концепции определены 10 наиболее важных характеристик агента, которые соответствуют его генотоксическому или промотирующему действию. Три из

них непосредственно связаны с потенциальной способностью вызывать повреждения структуры ДНК. В их числе: электрофильность и способность образовывать электрофильные метаболиты; генотоксичность — способность вызывать повреждение ДНК в виде разрывов, модификаций оснований, аддуктов, межнитевых сшивок, одно- и двухпочечных разрывов; способность повышать уровень активных форм кислорода, что сопровождается опосредованным генотоксическим эффектом. Еще 7 характеристик потенциального канцерогенного агента непосредственно не ассоциированы с повреждением структуры ДНК и связаны со способностями изменять функционирование системы эпигенетической регуляции транскрипции, подавлять процессы репарации ДНК, индуцировать хроническое воспаление, вызывать иммунодефицитные состояния, взаимодействовать с рецепторами клетки, приводить к иммортализации клеток, активировать пролиферацию и ингибировать клеточную гибель. При этом получение новых механистических данных необходимо, чтобы не только выявить проканцерогенное действие агента, но и определить наиболее актуальные эпидемиологические исследования по оценке канцерогенной опасности, в том числе возможных онкогенных компонентов микробиоты и виroma.

На основании данных эпидемиологических исследований, продемонстрировавших повышение заболеваемости ЗНО при инфицировании вирусом или микроорганизмом, МАИР отнесло к группе агентов высокой канцерогенной опасности (группа 1) 7 эукариотических вирусов и 1 бактерию (табл. 1).

В 2018 г. число случаев ЗНО в мире, однозначно сопряженных с действием биологических агентов, составило 2,2 млн [34]. Среди канцерогеноопасных биологических агентов безусловным лидером по распространенности в популяции человека является бактерия *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), с инфицированием которой связывают повышенный риск развития рака желудка и ряда других ЗНО. По расчетам эпидемиологов, ежегодно инфицированием *H. pylori* обусловлено 810 тыс. случаев рака желудка [17, 18].

Этиологическим фактором высокого риска возникновения рака шейки матки являются представители многочисленной группы вирусов папилломы человека (HPV) (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66-го типов), из которых наибольший канцерогенный эффект оказывают 16-й и 18-й типы. Около 690 тыс. случаев рака шейки матки связывают с инфицированием этими типами HPV [17, 18].

Инфицирование вирусами гепатитов В (HBV) и С (HCV) способствует развитию гепатокарцином. По данным эпидемиологов, ежегодно регистрируют 360 тыс. случаев этого заболевания, ассоциированных с HBV, и 160 тыс. случаев, ассоциированных с HCV [17, 19].

Инфицирование вирусом Эпштейна–Барр способствует развитию рака носоглотки, желудка,

Таблица 1. Микроорганизмы, потенциально входящие в микробиоту человека (по классификации канцерогенов Международного агентства по изучению рака (МАИР) (International Agency for Research on Cancer))

Table 1. Microorganisms, potentially contained in human microbiota (by International Agency for Research on Cancer (IARC) carcinogen classification)

Микроорганизм Microorganism	Индукцируемые злокачественные новообразования (по данным МАИР) Induced cancers (IARC data)	Проканцерогенный эффект Procarcinogenic effect	Новые данные о канцерогенности микроорганизма/вируса New data on carcinogenicity of microorganism/virus	Источник Reference
Группа 1 – доказанная канцерогенность для человека Group 1. Carcinogenic for human				
Вирус Эпштейна–Барр (EBV) Epstein–Barr virus (EBV)	Лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома Burkitt lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma	Индукция пролиферации, генетической нестабильности, миграция клеток, ингибирование апоптоза Induction of proliferation, genomic instability, cell migration, inhibition of apoptosis	Вызывает рак желудка, слюнных желез, ассоциированные с синдромом приобретенного иммунного дефицита, лимфомы и лейомиосаркомы при иммунодефицитах Causes gastric cancer, salivary gland carcinoma, associated with acquired immune deficiency syndrome lymphomas, and leiomyosarcomas under immunosuppression	[20]
Вирус гепатита В Hepatitis B virus	Гепатоцеллюлярная карцинома, холангиокарцинома, неходжкинская лимфома Hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and non-Hodgkin lymphoma	Индукция воспаления, генетической нестабильности, миграция клеток, влияние на клеточный сигналинг Induction of inflammation, genomic instability, cell migration, influence on cell signaling	Способствует развитию холангиокарцином, неходжкинских лимфом Promotes the development of cholangiocarcinomas, non-Hodgkin lymphomas	[21, 22]
Вирус гепатита С Hepatitis C virus	Гепатоцеллюлярная карцинома, лимфомы и холангиокарцинома Hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and lymphomas	Индукция воспаления, генетической нестабильности, миграция клеток, влияние на клеточный сигналинг Induction of inflammation, genomic instability, cell migration, influence on cell signaling	Вызывает холангиокарциномы, неходжкинские лимфомы Causes cholangiocarcinomas, Non-Hodgkin lymphomas	[21, 22]
Герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши Kaposi sarcoma-associated herpesvirus	Саркома Капоши, первичная выпотная лимфома, мультицентрическая болезнь Кастлемана и множественная миелома Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, multicentric Castlemans disease, and multiple myeloma	Индукция пролиферации, генетической нестабильности, миграция клеток, ингибирование апоптоза Induction of proliferation, genomic instability, cell migration, inhibition of apoptosis	Способствует развитию неходжкинских лимфом у пациентов с синдромом приобретенного иммунодефицита Promotes the development of Non-Hodgkin lymphomas presenting in acquired immune deficiency syndrome patients	[23]
Вирус иммунодефицита человека 1 Human immunodeficiency virus 1	Саркома Капоши, лимфома Беркитта, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, рак шейки матки Kaposi sarcoma, Burkitt lymphoma, diffuse large B cell lymphoma, cervical cancer	Подавление иммунитета Immunosuppression	Вызывает неходжкинские лимфомы, рак легкого, анальный, колоректальный рак, гепатокарциному, лимфому Ходжкина Causes non-Hodgkin lymphomas, lung, anal, colorectal, liver carcinomas, Hodgkin lymphoma	[24]

Продолжение табл. 1
Continuation of table 1

Микроорганизм Microorganism	Индуцируемые злокачественные новообразования (по данным МАИР) Induced cancers (IARC data)	Проканцерогенный эффект Procarcinogenic effect	Новые данные о канцерогенности микроорганизма/вируса New data on carcinogenicity of microorganism/virus	Источник Reference
Вирус папилломы человека (HPV) 16-го типа Human papillomavirus (HPV) type 16	Рак шейки матки, влагалища, рак вульвы, мочевого пузыря, карцинома полового члена, анальная карцинома Cervical cancer, vaginal cancer, vulvar cancer, bladder cancer, penile carcinoma, anal carcinoma	Иммортализация, индукция геномной нестабильности, ингибирование репарации ДНК, апоптоза Immortalisation, induction of genomic instability, inhibition of DNA repair, apoptosis	Способствует развитию рака ротоглотки (плоскоклеточной карциномы головы и шеи) Promote oropharyngeal cancer (squamous cell carcinoma of the head and neck)	[25]
HPV 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59-го типов HPV types 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Рак шейки матки Cervical cancer	Иммортализация, индукция геномной нестабильности, ингибирование репарации ДНК, апоптоза Immortalisation, induction of genomic instability, inhibition of DNA repair, apoptosis	Способствует развитию рака ротоглотки (плоскоклеточной карциномы головы и шеи) Promote oropharyngeal cancer (squamous cell carcinoma of the head and neck)	[26]
Т-клеточный лимфотропный вирус человека Human T-cell lymphotropic virus type 1	Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых Adult T-cell leukemia/lymphoma	Иммортализация и трансформация Т-клеток Immortalisation and transformation of T cells	—	—
<i>Helicobacter pylori</i>	Аденокарцинома и MALT-лимфома (из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой желудка) Adenocarcinoma and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma	Индукция воспаления, генетической нестабильности, окислительного стресса, нарушение регуляции клеточного цикла, эпигенетической регуляции транскрипции Induction of inflammation, genetic instability, oxidative stress, cell cycle dysregulation, epigenetic regulation of transcription	Инфекция <i>Helicobacter pylori</i> ассоциирована со снижением риска развития аденокарциномы пищевода <i>Helicobacter pylori</i> infection is associated with reduced risk of esophageal adenocarcinoma	[27]
Группа 2A – вероятная канцерогенность для человека Group 2A – probable carcinogens for human				
Малярийный плазмодий <i>Plasmodium falciparum</i> (Malaria)	Лимфома Беркитта, ассоциированная с EBV Burkitt lymphoma associated with EBV	Пролиферация В-клеток, ингибирование апоптоза, реактивация латентного EBV, увеличение активности АИД, вызванные малярийными антигенами B cell proliferation, inhibition of apoptosis, reactivation of latent EBV, increase in AID activity caused by malaria antigens	Ассоциация показана для лимфомы Ходжкина и неходжкинских лимфом. Сочетанная инфекция с вирусом иммунодефицита человека или хроническим гепатитом В и С не влияет на частоту развития злокачественных новообразований Association was shown for Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. Co-infection with human immunodeficiency virus or chronic hepatitis B and C does not influence on cancer frequency	[28]

Продолжение табл. 1
Continuation of table 1

Микроорганизм Microorganism	Индукцируемые злокачественные новообразования (по данным МАИР) Induced cancers (IARC data)	Проканцерогенный эффект Procarcinogenic effect	Новые данные о канцерогенности микроорганизма/вируса New data on carcinogenicity of microorganism/virus	Источник Reference
HPV 68-го типа HPV type 68	Рак шейки матки Cervical cancer	Иммортализация, индукция геномной нестабильности, ингибирование репарации ДНК, апоптоза Immortalisation, induction of genomic instability, inhibition of DNA repair, apoptosis	Вызывает плоскоклеточную карциному головы и шеи Causes head and neck squamous cell carcinoma	[29]
Полиомавирус клеток Меркеля Merkel cell polyomavirus	Карцинома из клеток Меркеля Merkel cell carcinoma	Экспрессия малых и больших Т-антигенов, обладающих проканцерогенными свойствами Expression of the small and large T-antigens, which have oncogenic properties	Присутствие полиомавируса Меркеля показано при различных видах рака, не относящихся к карциноме из клеток Меркеля Presence of the virus was shown in various non-Merkel cell carcinoma cancers	[30]
Группа 2B – возможная канцерогенность для человека Group 2B – possible carcinogens for human				
Вирус иммунодефицита человека 2-го типа Human immunodeficiency virus type 2	Саркома Капоши и неходжкинские лимфомы Kaposi sarcoma and non-Hodgkin lymphoma	Развитие иммунодефицитного состояния Appearance of immune deficiency	Показана устойчивость вируса к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы Human immunodeficiency virus type 2 is resistant to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and some protease inhibitors	[31]
HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82-го типов HPV types 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Рак эндометрия Cervix cancer	Деградация p53 из-за действия вирусного белка E6, индукция перехода G1 → S, снижение экспрессии ингибиторов циклинов. P53 degradation by viral E6, induction of G1-S transition, decrease of cyclin inhibitors	При плоскоклеточном раке носовых пазух идентифицирован новый вариант HPV – 82-го типа. A new variant of the HPV – type 82 – in laryngeal squamous cell carcinoma	[32]
HPV 30, 34, 69, 85, 97-го типов HPV types 30, 34, 69, 85, 97	–	Высокая гомологичность HPV группы 1 Phylogenetic similarity to HPV of Group 1	–	–
HPV 5-го и 8-го типов HPV types 5 and 8	Немеланомные опухоли кожи – агрессивная HPV-ассоциированная плоскоклеточная карцинома, возникающая у пациентов с верруциформной эпидермодисплазией Non-melanoma HPV-associated cutaneous malignancies – Aggressive squamous cell carcinoma in patients with epidermodysplasia verruciformis	Деградация p53 из-за действия вирусного белка E6, индукция перехода G1 → S, снижение экспрессии ингибиторов циклинов. P53 degradation by viral E6, induction of G1-S transition, decrease of cyclin inhibitors	Белок E6 HPV 5-го и 8-го типов сенситизирует клетки к действию ультрафиолетового облучения путем влияния на репарацию двухцепочечных разрывов ДНК HPV 5 and 8 types E6 protein sensitizes the cells to UVB exposure by disrupting the DNA double-strand break repair mechanisms	[33]

Окончание табл. 1
End of table 1

Микроорганизм Microorganism	Индукцируемые злокачественные новообразования (по данным МАИР) Induced cancers (IARC data)	Проканцерогенный эффект Procarcinogenic effect	Новые данные о канцерогенности микроорганизма/вируса New data carcinogenicity microorganism/virus	Источник Reference
Полиомавирус JC Polyomavirus JC	В латентном периоде выявляется в лимфоидной и почечной тканях It persists quiescently in lymphoid and renal tissues during latency	Влияние на p53, β-катенин, IRS, Rb, трансформирующий фактор роста β-1 (TGF-β1), фосфоинзитид-3-киназу (PI3K), Akt and AMPK It targets p53, β-catenin, IRS, Rb, transforming growth factor beta 1 (TGF-β1), phosphoinositide 3-kinases (PI3K), Akt and AMPK signal pathways in cancer cells	Предложена вовлеченность полиомавируса JC в патогенез опухолей мозга человека Polyomavirus JC is proposed to be involved in pathogenesis of human brain tumors	[34]
Вирус ВК Virus BK	Противоречивые эпидемиологические данные относительно людей. Фибросаркомы на сайте введения вируса у животных Conflicting epidemiological data on humans. Fibrosarcomas at the site of virus administration in animals	Модулирование T-аг вируса клеточного сигналинга Modulation of T-ag cell signaling virus	T-аг вируса выявлен при раке и гиперплазии предстательной железы, раке мочевого пузыря T-ag virus has been detected in genome detection in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia tissue	[35, 36]

лимфом Ходжкина, Беркитта, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомы назального типа (240 тыс. случаев в год) [37].

Вирус герпеса человека (HHV) 8-го типа является этиологическим фактором, способствующим развитию множественного геморрагического саркоматоза, описанного впервые венгерским врачом Морисом Капоши, в связи с чем он также известен как герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши. Инфицирование этим вирусом вызывает появление ангиосарком, поражающих кожу, слизистую оболочку ротовой полости, лимфатические узлы и внутренние органы. Ежегодно регистрируют 34 тыс. случаев ЗНО, связанных с HHV 8-го типа [38].

Инфицирование вирусом иммунодефицита человека (HIV) ослабляет иммунную систему и снижает способность организма бороться с вирусными инфекциями, в том числе канцерогенноопасными [39]. Люди, инфицированные HIV, имеют значительно более высокий риск развития некоторых видов ЗНО по сравнению с людьми того же возраста, у которых его нет. Три из этих видов злокачественных опухолей известны как ЗНО, определяющие синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). К ним относятся саркома Капоши, агрессивная В-клеточная неходжкинская лимфома и рак шейки матки. Наличие любого из этих видов рака у человека, инфицированного HIV, свидетельствует о диагнозе СПИД. По сравнению с населением в целом у пациентов, инфицированных HIV, в настоящее время примерно в 500 раз чаще диагностируют саркому Капоши, в 12 раз — неходжкинские лимфомы, а среди женщин в 3 раза чаще — рак шейки матки. По оценкам эпидемиологов, ежегодно регистрируют около 95 тыс. случаев ЗНО, ассоциированных с HIV [39, 40].

T-лимфотропный вирус человека 1-го типа, или вирус T-клеточного лейкоза человека 1-го типа, — первый вирус человека, онкогенность которого была доказана. Его наличие ассоциировано с T-клеточным лейкозом и T-клеточной лимфомой. Считается, что 10 млн людей инфицированы данным вирусом; ежегодно регистрируют 3600 случаев T-клеточного лейкоза человека, связанного с T-лимфотропным вирусом человека 1-го типа [34, 40].

К группе вероятных канцерогенных агентов (группе 2A) отнесены малярийный плазмодий (*Plasmodium falciparum*), HPV 68-го типа и полиомавирус клеток Меркеля, в отношении которых отсутствуют эпидемиологические данные, однозначно подтверждающие ассоциацию инфицирования данным агентом и ЗНО. Однако установлена связь наличия в организме *Plasmodium falciparum* с эндемической лимфомой Беркитта. Также при инфицировании *Plasmodium falciparum* выявлены активация вируса Эпштейна–Барр и увеличение численности популяции В-клеток, в связи с чем данный микроорганизм, относящийся к царству

простейших, отнесен к вероятным канцерогенным агентам [36].

Эпидемиологические данные о канцерогенной опасности HPV 68-го типа менее убедительны, чем типов HPV, отнесенных к группе 1, однако их все же следует рассматривать как «ограниченные». Кроме того, механистические данные о влиянии HPV 68-го типа на клетки эпителия свидетельствуют о проканцерогенном действии данного типа вируса.

Ассоциация полиомавируса клеток Меркеля (MCV) с развитием ЗНО оценена эпидемиологами лишь в нескольких исследованиях «случай – контроль», что позволяет считать полученные данные ограниченными. В то же время интегрированный геном этого вируса обнаружен в большинстве карцином Меркеля. Механистические данные свидетельствуют о том, что инфицирование клеток этим вирусом сопровождается изменением клеточного сигналинга проканцерогенной направленности. Ограниченные эпидемиологические сведения в совокупности с убедительными результатами механистических исследований позволили отнести MCV к группе вероятных канцерогенных агентов (группе 2А) [36].

К группе возможных канцерогенных агентов (группе 2Б) отнесены 3 подгруппы HPV, HIV 2-го типа и полиомавирусы человека 1-го (вирус ВК, ВКV) и 2-го (вирус JC, JCV) типов. Возможными канцерогенными агентами признаны HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73 и 82-го типов, поскольку получены очень ограниченные или неадекватные эпидемиологические и некоторые механистические данные об их проканцерогенном эффекте, выражающемся в повышении уровня деградации p53, индукции перехода G1 → S и подавлении экспрессии ингибиторов циклинов. HPV 30, 34, 69, 85 и 97-го типов отнесены к группе 2Б из-за высокого уровня гомологии с HPV групп 1 и 2А, и, наконец, HPV 5 и 8-го типов включены в группу возможных канцерогенов, поскольку они преимущественно обнаружены в опухолях пациентов с верруциформной эпидермодисплазией.

Эпидемиологические данные о канцерогенном эффекте HIV 2-го типа признаны неадекватными; индукция иммуносупрессии этим вирусом происходит существенно менее активно по сравнению с HIV 1-го типа. В то же время наблюдаемая при инфицировании HIV 2-го типа иммуносупрессия позволяет отнести этот вирус к возможным канцерогенным агентам [40].

Вирус ВК отнесен к группе 2Б, так как эпидемиологические данные о его вовлеченности в канцерогенез весьма противоречивы. Однако результаты экспериментов на животных свидетельствуют о его потенциальной канцерогенности.

В ходе эпидемиологических исследований ассоциации инфицированности JCV с каким-либо типом опухолей выявлено не было, однако канцерогенный эффект этой вирусной инфекции убедительно продемонстрирован в экспериментах на животных, что позволило включить его в группу 2Б [40].

После опубликования в 2012 г. монографии МАИР по канцерогенной опасности биологических агентов получены новые данные как о видах индуцируемых этими агентами ЗНО, так и о механизмах их действия (см. табл. 1).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ МИКРОБИОТЫ НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ

В последние годы опубликованы механистические данные, полученные с помощью различных модельных систем, свидетельствующие о потенциальном проканцерогенном действии дисбиоза, опосредующего увеличение доли определенных условно-патогенных микроорганизмов и снижение количества микроорганизмов, способствующих нормальному пищеварению, активации врожденного и формированию приобретенного иммунитета, продуцирующих витамины, антиоксидантные и противовоспалительные соединения [41]. Наиболее распространенные механизмы, посредством которых отдельные представители микробиоты могут влиять на канцерогенез, представлены ниже.

Продукция генотоксического агента. *E. coli* и другие энтеробактерии продуцируют колибактин, представляющий собой гибрид полипептида и нерибосомального пептида. Под действием колибактина происходит образование межнитевых сшивок и двухцепочечных разрывов ДНК, что приводит к хромосомной нестабильности [42]. Еще одними генотоксичными агентами, продуцируемым граммотрицательными бактериями γ - и ϵ -классов типа *Proteobacteria*, являются цитолетальные растягивающие токсины, представляющие собой гетеротримеры, в которых белковые субъединицы CdtA и CdtC выполняют связывающую функцию, а CdtB гомологичен ДНКазе I млекопитающих и, соответственно, обладает ДНК-азной активностью [43]. Цитолетальные растягивающие токсины вызывают хромосомную нестабильность, а в высоких концентрациях – остановку клеточного цикла в фазах G2/M и гибель клеток. Впоследствии это приводит к нарушению барьерной функции эпителия кишечника и развитию колита.

Индукция активных форм кислорода. Активные формы кислорода (АФК) представляют собой короткоживущие электрофильные радикалы (супероксид, O_2^-) и нерадикальные пероксидные формы (H_2O_2) неполного восстановления кислорода. Они необходимы для уничтожения микроорганизмов, попавших в фагоцитирующие клетки организма человека [44]. В нефагоцитарных клетках АФК представляют собой побочные продукты аэробного дыхания, вызывающие повреждение жизненно важных макромолекул клеток, в том числе ДНК. Редокс-чувствительный сигнальный путь Keap1/Nrf2/ARE обеспечивает механизм регуляции уровня АФК путем транскрипционно регулируемого синтеза супероксиддисмутазы, многочисленных каталаз и других богатых цистеином белков и пептидов, снижающих уровень АФК.

Бактерии, обладающие повышенными адгезией или способностью проникать в слизистые оболочки верхних дыхательных путей, мочеполовой и пищеварительной систем, глазных век и слуховых проходов, могут взаимодействовать с клеточными рецепторами, в частности с Toll-подобными рецепторами (TLR) и формилпептидными рецепторами (FPR), непосредственно регулируя уровень АФК в фагоцитах и эпителии. Например, *H. pylori* индуцирует значительное повышение уровня АФК, как активируя фагоцитоз нейтрофилами, высвобождающими АФК, так и продуцируя токсин SagA, который изменяет клеточный сигналинг и наряду с индукцией эпителиально-мезенхимального перехода активирует продукцию АФК в клетках эпителия организма-хозяина.

Индукция хронического воспаления. Этот механизм проканцерогенного эффекта микробиоты обусловлен продукцией токсинов и цитокинов, запускающих провоспалительный сигналинг. Примером провоспалительных токсинов является термостабильный компонент наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов, обеспечивающий структурную целостность бактериальной клетки, защищающий мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. Этот эндотоксин распознается TLR4, что приводит к экспрессии провоспалительных цитокинов – интерлейкинов (IL) 18 и 6, фактора некроза опухоли (TNF), интерферона (IFN), IL-33 и ряда других, а также к активации основного компонента провоспалительного сигналинга – транскрипционно-ядерного фактора κB (NF-κB).

Влияние на сигнальные пути клеток организма-хозяина. Кроме уже описанного влияния на клеточный сигналинг путем активации TLR4, микроорганизмы могут вызывать активацию пролиферации, ингибирование апоптоза и повышение миграционной активности эпителиоцитов, воздействуя на комплекс E-кадгерина и β-катенина. Так, *Bacteroides fragilis* продуцируют токсин Bft, который вызывает расщепление E-кадгерина и, нарушая межклеточные контакты эпителиоцитов организма-хозяина, активирует β-катенин. Таким путем запускается сигнальный путь WNT/β-катенин. Это приводит к повышению пролиферативной активности клеток организма-хозяина и подавлению в них апоптоза. *Fusobacterium nucleatum* продуцируют FadA, который, взаимодействуя с E-кадгеринном, находящимся в комплексе с β-катенином, способствует его фосфорилированию и интернализации, что вызывает высвобождение β-катенина, транслоцирующегося в ядро и активирующего экспрессию провоспалительных генов (таких как NF-κB) и онкогенов (таких как *Myc* и *Cyclin D1*) [45]. Кроме того, разрушение комплекса E-кадгерина и β-катенина приводит к повышению миграционной активности эпителиоцитов и способствует эпителиально-мезенхимальному переходу.

Снижение продукции короткоцепочных жирных кислот. Снижение продукции этих кислот, прежде всего

масляной кислоты, также является возможным проканцерогенным эффектом микробиоты. Короткоцепочные жирные кислоты оказывают антиканцерогенное действие путем защитного эффекта в отношении межклеточных контактов и комплекса E-кадгерина и β-катенина. Кроме того, масляная кислота является ингибитором гистоновых деацетилаз; снижение ее продукции приводит к активации клеточной пролиферации и подавлению апоптоза [46, 47].

Доставка биологически активных соединений, продуцируемых микроорганизмами, в клетки организма-хозяина может осуществляться диффузно, за счет распространения с помощью микровезикул, а также при проникновении микроорганизмов и вирусов непосредственно в ткани, кровеносные и лимфатические сосуды организма-хозяина в случае повреждения целостности эпителиального слоя. Особую роль в доставке биологически активных соединений играют экстрацеллюлярные везикулы (ЭВ), продуцируемые микроорганизмом. Они могут проходить через слой муцина и проникать в клетки эпителия путем эндоцитоза при диаметре 20–100 нм и микропиноцитоза при диаметре 90–450 нм, перенося концентрированные смеси ДНК, РНК, белков, пептидогликанов, липидов и других биологически активных молекул, которые взаимодействуют с PRR клетки, активирующими определенные сигнальные пути [48, 49].

Помимо слоя муцина контакту кишечного содержимого с клетками подслизистой препятствует механический барьер кишечного эпителия, прочно скрепленного белками плотных контактов. Экстрацеллюлярные везикулы патогенных бактерий ослабляют их и делают возможным проникновение патогенных микроорганизмов в подслизистую и кровеносное русло. Перенос факторы адгезии, в частности, секретирываемые *Bifidobacterium longum*, ЭВ способствуют образованию колоний бактерий различных видов, а в случае переноса ингибиторов – их диссеминации. Таким образом, в бактериальном сообществе ЭВ кишечной микробиоты играют большую роль в регуляции ее баланса.

Молекулярные механизмы участия эукариотических и бактериальных вирусов в канцерогенезе. Основными механизмами проканцерогенного действия эукариотических и бактериальных вирусов являются:

- нарушение целостности генома клеток организма-хозяина. Вирусная интеграция требует появления двухцепочечных разрывов в геномной ДНК, соответственно, структурные изменения происходят в результате интеграционного события. Кроме того, хроническая вирусная инфекция может привести к иммунным реакциям, которые также вызывают нестабильность генома из-за повышения уровня АФК [50];
- преодоление репликативного старения. Ретровирусы содержат обратную транскриптазу, что способствует удлинению теломер и иммортализации

клеток, а ДНК-вирусы, экспрессируя белки Е6 и Е7, влияют на активность теломеразы [50];

- влияние на клеточный сигналинг. Вирусные белки (например, большой и малый Т-антигены полиомавирусов, белки папилломавирусов Е6 и Е7) ускоряют прохождение клеточного цикла, ингибируют белки-супрессоры опухолевого роста p53 и RB, приводя к увеличению пролиферативной активности и ингибированию апоптоза [51];
- индукция хронического воспаления. Хроническая вирусная инфекция приводит к воспалению путем активации NF-κB, MAPK и STAT3. Секретия цитокинов инфицированной клеткой и окружающими тканями при воспалении вызывает активацию IL-1β, TNF-α и IL-6, что приводит к промоции опухолевого роста [52];
- бактериофаги, инфицирующие бактериальные клетки, могут существенным образом влиять на состав микробиоты, особенно если репликация вируса сопровождается лизисом бактериальных клеток, что, в свою очередь, способствует развитию воспаления [8]. Кроме того, бактериальные вирусы благоприятствуют горизонтальному переносу генетической информации, что потенциально влияет на вирулентность и патогенность микроорганизмов.

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА ОТ МИКРОБИОТЫ И ВИРОМА

Основоположником иммунотерапии рака принято считать Вильяма Брэдли Коли, который в 1880 г. в ходе анализа историй болезни пациентов с ЗНО нашел информацию о полной регрессии опухоли у больного с саркомой мягких тканей после развития инфекционного заболевания, вызванного *Streptococcus pyogenes*, — рожистого воспаления кожи и подкожной клетчатки. Интересно, что и 7 лет спустя у этого пациента отсутствовали какие-либо проявления ЗНО. В.Б. Коли нашел описание более 40 аналогичных случаев в опубликованных медицинских исследованиях и разработал схему лечения на основе введения в организм онкологического больного токсина убитых нагреванием стрептококковых микроорганизмов (в сочетании с *Serratia marcescens*). Этот токсин был использован в лечении почти 1000 пациентов с остеосаркомами и саркомами мягких тканей; в 50 % случаев наблюдался противоопухолевый эффект [53].

К настоящему времени продемонстрировано, что микробиота может активировать врожденный и формировать приобретенный иммунитет. Отчасти это объясняет как положительные, так и отрицательные результаты использования токсина Коли. Данные, полученные в ходе экспериментов на гнотобиотических животных, подтвердили, что отсутствие кишечной микробиоты у стерильных мышей приводит к иммунной дисфункции, включая дефекты лимфоидной ткани,

уменьшение размеров пейеровых бляшек, количества интраэпителиальных лимфоцитов в кишечнике, недостаточный гуморальный иммунитет слизистой оболочки и снижение секреции иммуноглобулинов и цитокинов, аномальное количество отдельных популяций иммунных клеток [54, 55]. Интересным примером такого влияния является эксперимент И.И. Иванова, проведенный на гнотобиотических мышах, в ходе которого продемонстрирован факт специфического воздействия сегментированных нитчатых (филаментных) бактерий (*Segmented filamentous*) на формирование популяции Т-хелперов Th17 в эпителии и собственной пластинке слизистой оболочки кишечника [56]. При отсутствии в микробиоте данного вида бактерий выявить Th17 в эпителии и собственной пластинке слизистой кишечника мышей не удавалось.

Иммуномодулирующее действие *Lactobacillus casei* BL23 у мышей C57BL6 приводило к снижению индуцированных азоксиметаном опухолей кишечника [57]. В присутствии данного бактериального штамма наблюдалось снижение уровня цитокина IL-22, а также повышение уровней экспрессии IL-17A, РНК-каспазы 7, каспазы 9 и Вiк. При этом этот штамм BL23 влияет на формирование популяций Th1, Th22, Th17, натуральных киллеров, нейтрофилов и макрофагов.

Кроме того, некоторые бактериальные штаммы могут оказывать непосредственное противоопухолевое действие. Так, в экспериментах *in vitro* фильтрованный супернатант среды культивирования от двух штаммов *S. thermophiles* — M17PTZA496 и TH982 — оказывал цитотоксическое действие на клетки аденокарциномы человека HT-29 [58].

Качественный и количественный состав вирома также важен для активации врожденного и формирования приобретенного иммунитета. Считается, что лишь около 1 % эукариотических вирусов можно отнести к патогенным или условно-патогенным, основная же часть вирома представлена непатогенными вирусами, присутствие которых оказывает положительное влияние на состояние иммунитета организма-хозяина и гомеостаз слизистой кишечника [59, 60]. Примером такого влияния является эффект кишечного мышинового норовируса, наличие которого модулирует интерфероновый сигналинг 1-го типа [61]. Бактериофаги представляют собой ключевые модуляторы бактериальных взаимодействий и экосистем в микробиомах. Хотя бактериофаги не заражают клетки человека, они имеют существенное сходство с эукариотическими вирусами, могут влиять на физиологию тканей хозяина и активировать противовирусные иммунные программы [62].

Влияние микробиоты и вирусов на иммунитет организма-хозяина, как уже было отмечено ранее, принято связывать с присутствием разнообразной популяции микроорганизмов, обеспечивающих иммунную стимуляцию в основном через PRR [6, 63]. Эпителиальные клетки кожи, слизистых желудочно-кишечного

тракта, дыхательной и мочеполовой систем, а также все клетки организма-хозяина, связанные с врожденным и приобретенным иммунитетом, снабжены обширным репертуаром PRR, которые регулируют сигнальные пути клеток, определяя их фенотипы в ответ на появление антигена, представляющего собой конкретный молекулярный образ. В соответствии с современными представлениями такие молекулярные образы получили названия микроб-/патоген-ассоциированные, или опасность-ассоциированные образы. Образраспознающие рецепторы могут быть перспективными мишенями для эффективной иммунотерапии рака, активируя или ингибируя их, что является в настоящее время предметом исследований. Кроме того, идентификация эффекторных звеньев сигналинга для PRR позволяет по-новому подойти к проведению комбинированной химиотерапии путем влияния на активируемые этими рецепторами мишени. Подтверждением перспективности данного подхода служат результаты проводимых с конца XX века клинических исследований по использованию в терапии опухолей IL-2 [64, 65]. Применение данного цитокина привело к полной регрессии опухоли у ряда пациентов, страдающих раком почки и меланомой [66].

На сегодняшний день в США одобрены для использования в терапии онкологических больных 3 агониста TLR, относящихся к PRR. Наиболее перспективным из них является агонист TLR7 имиквимод (алдара). Этот препарат активирует TLR7, запуская NF-κB-опосредованную продукцию цитокинов IL-1, -6, -12 и TNF-α, в результате чего повышается противоопухолевая цитотоксичность CD8⁺-Т-лимфоцитов [67].

В организме человека есть система регуляции иммунного ответа, препятствующая запуску аутоиммунных процессов, так называемая система иммунных контрольных точек. Опухолевые клетки могут использовать такие контрольные точки для предотвращения активации опухоль-специфических лимфоцитов, таким образом приобретая устойчивость к действию иммунной системы благодаря передаче ингибирующего сигнала через рецепторы CTLA-4 и рецептор программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) [68]. В нескольких исследованиях представлены данные о влиянии микробиоты кишечника на эффективность иммунотерапии ингибиторами иммунных контрольных точек при меланоме, немелкоклеточном раке легкого, почечно-клеточном раке, гепатоцеллюлярной карциноме и других солидных опухолях.

ВНУТРИОПУХОЛЕВАЯ МИКРОБИОТА КАК ФАКТОР МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ

Сложная связь между раком и его микроокружением уже давно является предметом пристального изучения. В последнее время оно вышло за рамки традиционного фокуса на опухолевые клетки в их непосредственном окружении. Также стали исследовать и менее заметный, но потенциально важный компонент — внутриопухолевую микробиоту [69]. Гипоксическая

и богатая питательными веществами микросреда опухоли в сочетании с подавлением иммунитета создает благоприятные условия для микробной колонизации [70]. Традиционное опухолевое микроокружение представляет собой экосистему, состоящую из разнообразных опухолевых, стромальных и многочисленных иммунных клеток, расположенных в сети нерегулярных сосудов и коллагена. Учет внутриопухолевых микроорганизмов при рассмотрении микроокружения опухоли представляет собой значительный прогресс в понимании биологии ЗНО. Это подчеркивает большую роль в патогенезе ЗНО микробных сообществ, влияющих на промацию и прогрессию опухоли, включая метастазирование, а также на эффективность противоопухолевого лечения [69]. Выявлено, что каждый тип опухоли имеет особый состав микробиоты. Бактерии, обнаруженные в образцах опухолей, в основном имеют внутриклеточную локализацию, причем они выявлены как в опухолевых, так и в иммунных клетках. Типы ЗНО различаются по доле опухолей, положительных по бактериальной ДНК. Так, при меланоме бактериальная инфекция обнаружена у 14,3 % пациентов, а при опухолях молочной, поджелудочной желез и остеосаркомах наличие внутриопухолевой микробиоты зафиксировано более чем в 60 % случаев. При этом очень важно выявить бактериальную ДНК в солидных опухолях, не имеющих прямой связи с внешней средой, таких как мультиформная глиобластома, остеосаркома и саркома мягких тканей [15, 71].

Внутриопухолевая микоплазменная инфекция описана при карциноме толстой кишки, раке желудка, пищевода, легкого, молочной, предстательной, поджелудочной желез, яичников, шейки матки, почек и глиоме. Микоплазмы могут активировать пролиферацию и миграцию клеток, а также подавлять апоптоз, способствуя промации и прогрессии опухоли.

Существует корреляция между кишечной и внутриопухолевой микробиотами. Микроорганизмы могут попадать в опухоли различными путями, например, через крово- и лимфообращение и протоки пищеварительной системы посредством преодоления слизистого барьера, который разрушается при развитии опухоли, а также из соседних нормальных тканей. Однако последний путь вызывает споры, для его доказательства требуются дополнительные исследования [72]. Еще одним источником внутриопухолевых микроорганизмов может быть оральная микробиота [73].

Схожи и механизмы проканцерогенного действия кишечной и внутриопухолевой микробиот. К ним относят повышенное образование АФК, повреждение ДНК, изменение активности сигнальных путей, в частности Wnt, а также инициацию воспаления и подавление иммунного ответа [72].

Установлено, что некоторые микроорганизмы могут способствовать пролиферации Treg-клеток, супрессорных клеток миелоидного происхождения и опухолевых клеток [74].

Помимо влияния на рост опухоли внутриопухолевая микробиота способна вызывать развитие метастазирования. Выявлены внутриопухолевые бактериальные консорциумы, которые могут быть маркерами локальных и отдаленных метастазов. Сообщается, что повышенное содержание внутриопухолевых бактерий семейства *Neisseriaceae* ускоряет метастазирование в лимфатические узлы при плоскоклеточной карциноме миндалин ротоглотки [75]. Присутствие в опухоли определенных микроорганизмов, таких как бактерии родов *Brevundimonas* и *Staphylococcus*, связано с развитием отдаленных метастазов при раке молочной железы [76]. При изучении микробиоты сарком мягких тканей обнаружено, что наличие HHV 6-го типа в опухолевых клетках ассоциировано с инфильтрацией опухоли НК-клетками (НК – естественные киллеры), что, по мнению авторов, обуславливает положительный прогноз в виде длительной выживаемости без отдаленных метастазов [71]. *F. nucleatum* участвует в регуляции процессов гибели клеток, таких как апоптоз и аутофагия, оказывающих влияние на метастазирование и развитие ЗНО [77, 78]. В последние годы опубликованы данные о воздействии внутриопухолевых бактерий на чувствительность к определенным химиопрепаратам. По мнению исследователей, внутриопухолевая продукция различными штаммами бактерий семейства *Streptomyces* антибиотика доксорубицина может привести к снижению эффективности химиотерапии этим препаратом. В настоящее время такие штаммы бактерий обнаружены в саркомах мягких тканей [79].

Отмечено, что внутриопухолевая микробиота может регулировать иммунные реакции организма-хозяина подобно микробиоте кишечника. Основными сигнальными путями, участвующими в иммунном ответе внутриопухолевой микробиоты, являются:

- активация сигнального пути TLR;
- активация пути NF-κB через пути β-катенина и TLR, что создает провоспалительную микросреду внутри опухоли и играет решающую роль в сложном влиянии микробов на развитие опухоли;
- активация генов INF (STING) – цитоплазматического ДНК-чувствительного белка, активируемого циклическими динуклеотидами, что приводит к экспрессии INF-β и провоспалительных генов;
- передача АФК. Микроорганизмы вызывают увеличение АФК, повреждение ДНК, снижение уровня NAD и последующее старение макрофагов M1, тем самым влияя на их функции и поведение;
- активация сигнального пути β-катенина. Такие микроорганизмы, как *H. pylori*, *S. typhi*, *F. nucleatum* и *B. fragilis*, активируют сигнальный путь β-катенина через прямые или опосредованные E-кадгерином механизмы [70].

Кроме того, внутриопухолевая микробиота может стимулировать врожденный и адаптивный иммунитет,

тем самым усиливая противоопухолевый иммунный ответ организма, что создает возможность использования ее в схемах лечения ЗНО. Для усиления противоопухолевого действия микробиоты можно применять методы целенаправленной инженерии. Путем модификации штамма бактерий рода *Salmonella*, приводящей к повышению уровня экспрессии Fas в опухолевых клетках, происходит активация апоптоза [80]. Эти инновационные подходы демонстрируют потенциал использования внутриопухолевой микробиоты для совершенствования противоопухолевых терапевтических средств.

Внутриопухолевая микробиота способна влиять на иммуногенную микросреду, что может повышать чувствительность опухоли к ингибиторам иммунных контрольных точек. Проводится работа по созданию генетически модифицированных микроорганизмов, предназначенных для производства антител против PD-1, что является революционным подходом в иммунотерапии рака, обеспечивая устойчивое, локализованное и целенаправленное лечение путем активации Т-клеток и нарушения тактики уклонения от иммунного ответа в микросреде опухоли [81]. Наряду с этим представляет интерес использование онколитических вирусов в противоопухолевой терапии. Сообщается, что комбинированная терапия *Talimogene laherparepvec* онколитическим вирусом герпеса с пембролизумабом – ингибитором иммунных контрольных точек PD-1 – позволяет достичь объективного ответа на иммунотерапию у 62 % пациентов с меланомой поздних стадий [82].

Таким образом, в будущем схемы и методы лечения ЗНО могут сочетать терапевтические и генетические подходы, направленные на формирование заданного состава микробиоты и инициацию ее специфических функций с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные представления о человеческом организме как о гнотобиоте, т. е. как о системе, состоящей из практически равного количества соматических и бактериальных клеток, содержащих различные вирусы, и реагирующей как единое целое, требуют пересмотра традиционного понимания патогенеза различных заболеваний, в том числе онкологических. Представленные в обзоре данные иллюстрируют участие микробиома и вирусов в инициации и промоции ЗНО, что имеет большое значение при разработке программ мероприятий по профилактике рака. В то же время сведения о влиянии микробиоты и вирусов на прогрессию злокачественных опухолей позволяют разрабатывать новые подходы к совершенствованию противоопухолевой терапии, определению прогноза заболевания и предсказанию эффективности терапии.

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

- Berg G., Rybakova D., Fischer D. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 2020;30(8):103. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0
- Bassler B.L. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 2002;109(4):421–4. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00749-3
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. A human homologue of the *Drosophila Toll* protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394–7. DOI: 10.1038/41131
- Thaiss C.A., Zmora N., Levy M., Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature* 2016;535(7610):65–74. DOI: 10.1038/nature18847
- Silverstein A.M. Paul Ehrlich's passion: the origins of his receptor immunology. *Cell Immunol* 1999;194(2):213–21. DOI: 10.1006/cimm.1999.1505
- Amarante-Mendes G.P., Adjemian S., Branco L.M. et al. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol* 2018;9:2379. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02379
- Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 2016;14(8):e1002533. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533
- Sepich-Poore G.D., Zitvogel L., Straussman R. et al. The microbiome and human cancer. *Science* 2021;371(6536):eabc4552. DOI: 10.1126/science.abc4552
- Liang G., Bushman F.D. The human virome: assembly composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2021;19(8):514–27. DOI: 10.1038/s41579-021-00536-5
- Белявская В.А., Чердынцева Н.В., Кжышковска Ю.Г., Литвяков Н.В. Микробиом, иммунная система и рак: три стороны одной медали. *Сибирский онкологический журнал* 2022;21(6):131–44. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-6-131-144
- Belyavskaya V.A., Cherdynitseva N.V., Kzhyshkovska J.G., Litvyakov N.V. Microbiome, immune system and cancer: three sides of the one medal. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2022;21(6):131–44. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-6-131-144
- Кайбышева В.О., Жарова М.Е., Филимендикова К.Ю., Никонов Е.Л. Микробиом человека: возрастные изменения и функции. *Доказательная гастроэнтерология* 2020;9(2):42–55. DOI: 10.17116/dokgastro2020902142
- Kaybysheva V.O., Zharova M.E., Filimendikova K.Yu. et al. Human microbiome: age-related changes and functions. *Dokazatel'naya gastroenterologiya = Russian Journal of Evidence-based Gastroenterology* 2020;9(2):42–55. (In Russ.). DOI: 10.17116/dokgastro2020902142
- Mima K., Ogino S., Nakagawa S. et al. The role of intestinal bacteria in the development and progression of gastrointestinal tract neoplasms. *Surg Oncol* 2017;26(4):368. DOI: 10.1016/j.suronc.2017.07.011
- Chen J., Domingue J.C., Sears C.L. Microbiota dysbiosis in select human cancers: evidence of association and causality. *Semin Immunol* 2017;32:25–34. DOI: 10.1016/j.smim.2017.08.001
- Zitvogel L., Pietrocola F., Kroemer G. Nutrition, inflammation and cancer. *Nat Immunol* 2017;18(8):843–50. DOI: 10.1038/ni.3754
- Nejman D., Livyatan I., Fuks G. et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* 2020;368(6494):973–80. DOI: 10.1126/science.aay9189
- Samet J.M., Chiu W.A., Cogliano V. et al. The IARC monographs: updated procedures for modern and transparent evidence synthesis in cancer hazard identification. *J Natl Cancer Inst* 2019;112(1):30–7. DOI: 10.1093/jnci/djz169
- De Martel C., Georges D., Bray F. et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health* 2020;8(2):e180–90. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7
- Biological agents. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, 2012. Vol. 100B. Available at: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Biological-Agents-2012>.
- Malaria and some polyomaviruses (SV40, BK, JC, and Merkel cell viruses). IARC monographs on the working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, 2012. Vol. 104. Available at: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Malaria-And-Some-Polyomaviruses-SV40-BK-JC-And-Merkel-Cell-Viruses-2013>.
- Shannon-Lowe C., Rickinson A. The global landscape of EBV-associated tumors. *Front Oncol* 2019;9:713. DOI: 10.3389/fonc.2019.00713
- Wang Y., Yuan Y., Gu D. Hepatitis B and C virus Infections and the risk of biliary tract cancers: a meta-analysis of observational studies. *Infect Agent Cancer* 2022;17(1):45. DOI: 10.1186/s13027-022-00457-9
- Zhang W., Du F., Wang L. et al. Hepatitis virus-associated non-hodgkin lymphoma: pathogenesis and treatment strategies. *J Clin Transl Hepatol* 2023;11(5):1256–66. DOI: 10.14218/JCTH.2022.00079S
- Labo N., Whitby D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: epidemiology and clinical features of related cancer. In: *Viruses and human cancer*. Ed. by S.D. Hudnall. NY: Springer, 2014. Pp. 323–340.
- Silverberg M.J., Lau B., Achenbach C.J. et al. Cumulative incidence of cancer among HIV-infected individuals in North America. *Ann Intern Med* 2015;163(7):507–18. DOI: 10.7326/M14-2768
- Taberna M., Mena M., Pavón M.A. et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* 2017;28(10):2386–98. DOI: 10.1093/annonc/mdx304
- Van Dyne E.A., Henley S.J., Saraiya M. et al. Trends in human papillomavirus-associated cancers – United States, 1999–2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67(33):918–24. DOI: 10.15585/mmwr.mm6733a2
- Whiteman D.C., Parma P., Fahey P. et al. Association of *Helicobacter Pylori* infection with reduced risk for esophageal cancer is independent of environmental and genetic modifiers. *Gastroenterology* 2010;139(1):73–83. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.04.009
- Wyss K., Granath F., Wängdahl A. et al. Malaria and risk of lymphoid neoplasms and other cancer: a nationwide population-based cohort study. *BMC Med* 2020;18:296. DOI: 10.1186/s12916-020-01759-8
- Tan L.S.Y., Fredrik P., Ker L. et al. High-risk HPV genotypes and P16INK4a expression in a cohort of head and neck squamous cell carcinoma patients in singapore. *Oncotarget* 2016;7(52):86730–9. DOI: 10.18632/oncotarget.13502
- Dimitraki M.G., Sourvinos G. Merkel cell polyomavirus (MCPyV) and cancers: emergency bell or false alarm? *Cancers (Basel)* 2022;14(22):5548. DOI: 10.3390/cancers14225548
- Ceccarelli G., Giovanetti M., Sagnelli C. et al. Human immunodeficiency virus type 2: the neglected threat. *Pathogens* 2021;10(11):1377. DOI: 10.3390/pathogens10111377
- Si-Mohamed A., Badoual C., Hans S. et al. An unusual human papillomavirus type 82 detection in laryngeal squamous cell carcinoma: case report and review of literature. *J Clin Virol* 2012;54(2):190–3. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.02.024
- Wallace J., Gonzalez H., Rajan R. et al. Anti-HIV drugs cause mitochondrial dysfunction in monocyte-derived macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 2022;66(4):e0194121. DOI: 10.1128/aac.01941-21

34. Passerini S., Prezioso C., Prota A. et al. Detection of human neurotropic JCPyV DNA sequence in pediatric anaplastic xanthoastrocytoma. *J Neurovirol* 2023;29(2):232–6. DOI: 10.1007/s13365-023-01129-z
35. Tavassoli N., Vojdani A., Salimi-Namin S. et al. Human BKV large T genome detection in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia tissue samples by nested PCR: a case-control study. *Mol Biol Res Commun* 2023;12(4):149–54. DOI: 10.22099/mbrc.2023.47537.1836
36. Starrett G.J., Buck C.B. BK Polyomavirus is a cause of bladder cancer. *Curr Opin Virol* 2019;39:8–15. DOI: 10.1016/j.coviro.2019.06.009
37. Wong Y., Meehan M.T., Burrows S.R. et al. Estimating the global burden of Epstein–Barr virus-related cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022;148(1):31–46. DOI: 10.1007/s00432-021-03824-y
38. Ibrahim Khalil A., Franceschi S., de Martel C. et al. Burden of Kaposi sarcoma according to HIV status: a systematic review and global analysis. *Int J Cancer* 2022;150(12):1948–57. DOI: 10.1002/ijc.33951
39. Hernández-Ramírez R.U., Shiels M.S., Dubrow R., Engels E.A. Cancer risk in HIV-infected people in the USA from 1996 to 2012: a population-based, registry-linkage study. *Lancet HIV* 2017;4(11):e495–504. DOI: 10.1016/S2352-3018(17)30125-X
40. Human immunodeficiency viruses and human T-cell lymphotropic viruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, 2012. Vol. 67. Available at: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Human-Immunodeficiency-Viruses-And-Human-T-Cell-Lymphotropic-Viruses-1996>.
41. Mirzaei R., Afaghi A., Babakhani S. et al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomed Pharmacother* 2021;139:11619. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111619
42. Nougayrède J.-P., Homburg S., Taieb F. et al. *Escherichia Coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006;313(5788):848–51. DOI: 10.1126/science.1127059
43. Hartl K., Sigal M. Microbe-driven genotoxicity in gastrointestinal carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2020;21(20):7439. DOI: 10.3390/ijms21207439
44. Jones R.M., Mercante J.W., Neish A.S. Reactive oxygen production induced by the gut microbiota: pharmacotherapeutic implications. *Curr Med Chem* 2012;19(10):1519–29. DOI: 10.2174/092986712799828283
45. Tian X., Liu Z., Niu B. et al. E-cadherin/β-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:567305. DOI: 10.1155/2011/567305
46. Stein R.A., Riber L. Epigenetic effects of short-chain fatty acids from the large intestine on host cells. *MicroLife* 2023;4. DOI: 10.1093/femsml/uqad032
47. Dzutsev A., Badger J.H., Perez-Chanona E. et al. Microbes and cancer. *Annu Rev Immunol* 2017;35(1):199–228. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052133
48. Turner L., Bitto N.J., Steer D.L. et al. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content. *Front Immunol* 2018;9:1466. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01466
49. Shi Y., Meng L., Zhang C. Extracellular vesicles of *Lactocaseibacillus paracasei* PC-H1 induce colorectal cancer cells apoptosis via PDK1/AKT/Bcl-2 signaling pathway. *Microbiol Res* 2021;255:126921. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126921
50. Pistello M., Antonelli G. Integration of the viral genome into the host cell genome: a double-edged sword. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(4):296–8. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.01.022
51. Spurgeon M.E., Liem A., Buehler D. et al. The Merkel cell polyomavirus T antigens function as tumor promoters in murine skin. *Cancers (Basel)* 2021;13(2):222. DOI: 10.3390/cancers13020222
52. Read S.A., Douglas M.W. Virus induced inflammation and cancer development. *Cancer Lett* 2014;345(2):174–81. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.07.030
53. Nauts H.C., McLaren J.R. Coley toxins – the first century. *Adv Exp Med Biol* 1990;267:483–500. DOI: 10.1007/978-1-4684-5766-7_52
54. Aghamajidi A., Maleki Vareki S. The effect of the gut microbiota on systemic and anti-tumor immunity and response to systemic therapy against cancer. *Cancers (Basel)* 2022;14(15):3563. DOI: 10.3390/cancers14153563
55. Wang M., Yang G., Tian Y. et al. The role of the gut microbiota in gastric cancer: the immunoregulation and immunotherapy. *Front Immunol* 2023;14:1183331. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1183331
56. Ivanov I.I. Microbe hunting hits home. *Cell Host Microbe* 2017;21(3):282–5. DOI: 10.1016/j.chom.2017.02.010
57. Jacouton E., Chain F., Sokol H. et al. Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Front Immunol* 2017;8:1553. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01553
58. Tarrah A., de Castilhos J., Rossi R.C. et al. *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Front Microbiol* 2018;9:2214. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02214
59. Buret A.G., Motta J.P., Allain T. et al. Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron? *J Biomed Sci* 2019;26(1):1. DOI: 10.1186/s12929-018-0495-4
60. Bordon Y. Microbiota: a viral understudy for commensal bacteria. *Nat Rev Immunol* 2015;15(1):4. DOI: 10.1038/nri3788
61. Kernbauer E., Ding Y., Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature* 2014;516(7529):94–8. DOI: 10.1038/nature13960
62. Champagne-Jorgensen K., Luong T., Darby T., Roach D.R. Immunogenicity of bacteriophages. *Trends Microbiol* 2023;31(10):1058–71. DOI: 10.1016/j.tim.2023.04.008
63. O’Neill L.A., Golenbock D., Bowie A.G. The history of Toll-like receptors – redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013;13(6):453–60. DOI: 10.1038/nri3446
64. Jiang T., Zhou C., Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2016;5(6):e1163462. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1163462
65. Considine B., Hurwitz M.E. Current status and future directions of immunotherapy in renal cell carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2019;21(4):34. DOI: 10.1007/s11912-019-0779-1
66. Rosenberg S.A., Yang J.C., Topalian S.L. et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA* 1994;30:271(12):907–13.
67. Smith M., Garcia-Martinez E., Pitter M.R. et al. Trial watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2018;7(12):e1526250. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1526250
68. Wu Z., Zhang S., Li L. et al. The gut microbiota modulates responses to anti-PD-1 and chemotherapy combination therapy and related adverse events in patients with advanced solid tumors. *Front Oncol* 2022;12:887383. DOI: 10.3389/fonc.2022.887383
69. Che S., Yan Z., Feng Y., Zhao H. Unveiling the intratumoral microbiota within cancer landscapes. *iScience* 2024;27(6):109893. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109893
70. Zhang L., Yu L. The role of the microscopic world: exploring the role and potential of intratumoral microbiota in cancer immunotherapy. *Medicine (Baltimore)* 2024;103(20):e38078. DOI: 10.1097/MD.00000000000038078
71. Perry L.M., Cruz S.M., Kleber K.T. et al. Human soft tissue sarcomas harbor an intratumoral viral microbiome which is linked with natural killer cell infiltrate and prognosis. *J Immunother Cancer* 2023;11(1):e004285. DOI: 10.1136/jitc-2021-004285
72. Yang L., Li A., Wang Y., Zhang Y. Intratumoral microbiota: roles in cancer initiation, development and therapeutic efficacy. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):35. DOI: 10.1038/s41392-022-01304-4
73. Wu J., Zhang P., Mei W., Zeng C. Intratumoral microbiota: implications for cancer onset, progression, and therapy. *Front Immunol* 2024;14:1301506. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1301506
74. Xu J., Cheng M., Liu J. et al. Research progress on the impact of intratumoral microbiota on the immune microenvironment

- of malignant tumors and its role in immunotherapy. *Front Immunol* 2024;15:1389446. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1389446
75. Rajasekaran K., Carey R.M., Lin X. et al. The microbiome of HPV-positive tonsil squamous cell carcinoma and neck metastasis. *Oral Oncol* 2021;117:105305. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2021.105305
76. Chiba A., Bawaneh A., Velazquez C. et al. Neoadjuvant chemotherapy shifts breast tumor microbiota populations to regulate drug responsiveness and the development of metastasis. *Mol Cancer Res* 2020;18(1):130–9. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0451
77. Chen G., Gao C., Jiang S. et al. *Fusobacterium nucleatum* outer membrane vesicles activate autophagy to promote oral cancer metastasis. *J Adv Res* 2024;56:167–79. DOI: 10.1016/j.jare.2023.04.002
78. Li L., Chandra V., McAllister F. Tumor-resident microbes: the new kids on the microenvironment block. *Trends Cancer* 2024;10(4):347–55. DOI: 10.1016/j.trecan.2023.12.002
79. Tiraboschi L., Braga D., Melacarne A. et al. Unveiling the impact of intratumoral microbiota in the treatment efficacy of soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 2024;84(6):1277. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2024-1277
80. Camacho E.M., Mesa-Pereira B., Medina C. et al. Engineering *Salmonella* as intracellular factory for effective killing of tumour cells. *Sci Rep* 2016;28(6):30591. DOI: 10.1038/srep30591
81. Groot A.J., Mengesha A., van der Wall E. et al. Functional antibodies produced by oncolytic clostridia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364(4):985–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.126
82. Ribas A., Dummer R., Puzanov I. et al. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and Improves anti-PD-1 immunotherapy. *Cell* 2017;170(6):1109–19.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.027

Вклад авторов

М.Г. Якубовская: определение структуры обзора, обобщение механистических данных, написание текста статьи;
 Т.И. Фетисов: обзор данных о роли микробиоты в патогенезе сарком мягких тканей, в том числе внутриопухолевой микробиоты;
 Л.Г. Соленова: анализ эпидемиологических данных о роли микробиоты и вирома в канцерогенезе, написание текста статьи;
 Н.И. Рыжова: анализ механистических данных о роли микробиоты и вирома в канцерогенезе, написание текста статьи;
 А.В. Лохонина: анализ данных о влиянии микробиоты и вирома на противоопухолевый иммунитет и микроокружение опухоли, написание текста статьи;
 И.А. Антонова: работа с базами данных, выбор наиболее значимых публикаций, подготовка списка литературы;
 Г.А. Белицкий: проведение системного анализа, обобщение данных, редактирование;
 К.И. Кирсанов: обобщение механистических данных о механизмах канцерогенного воздействия, редактирование;
 В.В. Агинова: подготовка материала о влиянии микробиоты на микроокружение опухоли.

Authors' contributions

M.G. Yakubovskaya: definition of the review structure, generalization of mechanistic data, article writing;
 T.I. Fetisov: review of data on the role of microbiota in the pathogenesis of soft tissue sarcoma, including intracellular microbiota;
 L.G. Solenova: analysis of epidemiological data on the role of microbiota and viroma in carcinogenesis, article writing;
 N.I. Ryzhova: analysis of mechanistic data on the role of microbiota and virome in carcinogenesis, article writing;
 A.V. Lokhonina: analysis of data on the effect of microbiota and viroma on antitumor immunity and tumor microenvironment, article writing;
 I.A. Antonova: working with data bases, selecting the most significant publications, preparing a list of references;
 G.A. Belitsky: conducting system analysis, summarizing data, editing;
 K.I. Kirsanov: generalization of mechanistic data on the mechanisms of carcinogenic effects, editing;
 V.V. Aginova: preparation of material on the effect of microbiota on the tumor microenvironment.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
 Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>
 Л.Г. Соленова / L.G. Solenova: <https://orcid.org/0000-0002-4443-8376>
 Н.И. Рыжова / N.I. Ryzhova: <https://orcid.org/0000-0002-4224-6303>
 А.В. Лохонина / A.V. Lokhonina: <https://orcid.org/0000-0001-8077-2307>
 И.А. Антонова / I.A. Antonova: <https://orcid.org/0009-0004-3482-8954>
 Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>
 К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>
 В.В. Агинова / V.V. Aginova: <https://orcid.org/0000-0003-1787-2676>

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-65-00003).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 23-65-00003).

Статья поступила: 08.12.2023. **Принята к публикации:** 01.11.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.
Article submitted: 08.12.2023. **Accepted for publication:** 01.11.2024. **Published online:** 11.12.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-23-40>

Иммунотерапия злокачественных глиом: современное состояние проблемы

А.А. Пичугин^{1,2}, Р.Р. Ковязина³, А.А. Трондин⁴, А.Г. Алексеев^{1,2}, П.Б. Копнин⁵, Т.В. Гессель¹, С.В. Бойчук^{1,6}

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

²ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр»; Россия, 420101 Казань, ул. Карбышева, 12А;

³Университет герцога Куньшаня; Китай, 215316 Куньшань, Цзянсу, Дьюк Авеню, 8;

⁴Клиника Сан-Карлос; Испания, 28040 Мадрид, Calle del Prof Martín Lagos, S/N, Moncloa – Aravaca;

⁵Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

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

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Злокачественные глиомы являются наиболее распространенными опухолями из клеток глиального ряда головного мозга у взрослых и характеризуются крайне неблагоприятным прогнозом. Терапия злокачественных глиом, как правило, включает максимально радикальное хирургическое удаление опухоли с последующим проведением лучевой терапии и/или химиотерапии.

В обзоре представлены основные клинико-морфологические и молекулярно-генетические характеристики глиом, их прогностическая значимость, а также роль в выборе тактики таргетной терапии с использованием соответствующих ингибиторов тирозинкиназ и моноклональных антител. Особое внимание уделяется современным аспектам в области иммунотерапии злокачественных глиом, таким как активация иммунных клеток и блокирование различных механизмов, используемых опухолью для уклонения от иммунной системы. Одним из наиболее изученных направлений иммунотерапии злокачественных новообразований является применение ингибиторов контрольных точек иммунного ответа. Данные препараты могут быть эффективны в лечении злокачественных глиом, в которых отмечается гиперэкспрессия молекул, оказывающих супрессорное действие на клетки иммунной системы. Еще одним перспективным направлением иммунотерапии является использование генетически модифицированных CAR-T-клеток (CAR – химерный антигенный рецептор), что подразумевает применение модифицированных иммунных клеток, способных распознавать и уничтожать опухолевые клетки. Помимо этого, к перспективным подходам иммунотерапии глиом относят цитокинотерапию и генную терапию, связанную с генным редактированием вирусов для производства онколитических вирусных вакцин. Разрабатываются вакцины, содержащие специфичные для опухолевых клеток антигены, которые могут стимулировать иммунную систему для их распознавания и последующего уничтожения.

Несмотря на перспективность иммунотерапии глиом, многие вышеперечисленные иммунотерапевтические подходы к лечению злокачественных глиом находятся на различных стадиях доклинических и клинических исследований, результаты некоторых из которых многообещающие.

Ключевые слова: глиома, глиобластома, опухоль головного мозга, таргетная терапия, иммунотерапия, цитокинотерапия, генная терапия

Для цитирования: Пичугин А.А., Ковязина Р.Р., Трондин А.А. и др. Иммунотерапия злокачественных глиом: современное состояние проблемы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):23–40.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-23-40>

Immunotherapy of malignant gliomas: a modern view on the problem

A.A. Pichugin^{1,2}, R.R. Koviazina³, A.A. Trondin⁴, A.G. Alekseev^{1,2}, P.B. Kopnin⁵, T.V. Gessel¹, S.V. Boichuk^{1,6}

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

²Interregional Clinical Diagnostic Center; 12A Karbysheva St., Kazan 420101, Russia;

³Duke Kunshan University; 8 Duke Avenue, Jiangsu Kunshan 215316, China;

⁴Hospital Clinico San Carlos; Calle del Prof Martín Lagos, S/N, Moncloa – Aravaca, Мадрид 28040, Spain;

⁵Carcinogenesis Institute of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

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

Contacts: Sergei Vasilyevich Boichuk boichuksergei@mail.ru

Malignant gliomas are one of the most common brain tumors in adults arising from glial cells with an extremely poor prognosis. Generally, therapy of malignant gliomas consists of radical surgical removal followed by radio- and/or chemotherapy. However, prognosis of the disease remains unfavorable.

The review presents main clinical, morphological and molecular characteristics of gliomas, their prognostic significance and role in the choice of targeted therapy based on using tyrosine kinase inhibitors and/or monoclonal antibodies. The current aspects of immunotherapy of gliomas (i.e., activation of immune cells, or blockage of immunosuppressive signaling) are discussed in detail. One of the well-known approaches of cancer immunotherapy is based on immune checkpoint inhibitors. These drugs might be effective in treatment of malignant gliomas overexpressing the molecules that suppress immune cells functions. Another promising approach of gliomas immunotherapy is based on genetically modified CAR-T cells (CAR – chimeric antigen receptor) which might identify and eliminate cancer cells. Cytokine therapy is also perspective treatment approach, as well as gene therapy which is associated with editing viral genes for production of oncolytic viruses used as anticancer vaccines. Vaccines are being developed to generate the specific antibodies recognized cancer cells and thereby stimulate the immune system to identify and destroy tumor cells.

Despite the promising potential of various gliomas immunotherapy methods, most of them are at different stages of preclinical and clinical trials. Some of them demonstrate promising results and good perspective for the further use to treat glioma patients.

Keywords: glioma, glioblastoma, brain tumor, targeted therapy, immunotherapy, cytokine therapy, gene therapy

For citation: Pichugin A.A., Koviazina R.R., Trondin A.A. et al. Immunotherapy of malignant gliomas: a modern view on the problem. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):23–40. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-23-40>

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы, образующиеся из глиальных клеток головного мозга, являются наиболее часто встречающимися первичными новообразованиями центральной нервной системы (ЦНС) и составляют около 80 % всех злокачественных опухолей головного мозга [1]. Согласно классификации опухолей ЦНС Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) данные новообразования имеют 4 степени злокачественности (grade 1–4), основанные на различных критериях, включающих гистологические и молекулярно-генетические различия опухолей, в том числе степени анаплазии, митотической активности, микроваскулярной пролиферации и некроза [1–5]. Для глиом низкой степени злокачественности (grade 1–2) характерны медленный рост и относительно хороший прогноз, что обуславливает более высокие показатели выживаемости по сравнению с глиомами высокой степени злокачественности (grade 3 и 4), которые встречаются преимущественно у пациентов молодого возраста [5, 6]. Глиомы высокой степени злокачественности отличаются стремительным ростом и неблагоприятным прогнозом. Более 75 % этих глиом представлены глиобластомами (ГБМ) (grade 4), которые являются наиболее агрессивными опухолями глиального ряда. Различия в клинко-морфологическом и молекулярно-генетическом профилях данных новообразований, а также иммуносупрессивная среда в опухоли – основные факторы, обуславливающие неэффективность

химио- (ХТ) и лучевой (ЛТ) терапии и плохой прогноз у пациентов с ГБМ. В настоящее время стремительно увеличивается число обзорных статей и клинических испытаний, различных подходов к иммунокоррекции ГБМ, что говорит о перспективности данного направления [7–12].

Цель работы – охарактеризовать клинко-морфологические и молекулярно-генетические особенности злокачественных глиом, а также современные методы иммунотерапии нарушений, выявляемых при ГБМ.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНЫХ ВИДОВ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

В глиомах и ГБМ довольно часто выявляют мутации в гене изоцитратдегидрогеназы 1-го типа (isocytate dehydrogenase 1, IDH1) (*IDH1*), кодирующем NADP⁺-зависимые гомодимеры IDH1, которая катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата до α -кетоглутарата (α -KG) [13]. Это, в свою очередь, может привести к гиперметилированию генома вследствие восстановления α -KG до 2-гидроксиглутарата, конкурентно ингибирующего α -KG-зависимые диоксигеназы [14, 15]. Данный тип мутаций наиболее характерен для астроцитом grade 2 и 3, а также для вторичных ГБМ, в которых частота мутаций гена *IDH1* может достигать 70–80 % случаев. В то же время такой

тип мутаций является крайне редкой находкой при первичных ГБМ ($\leq 10\%$ случаев) [16, 17]. В связи с этим вполне логичными выглядят данные, указывающие на то, что вышеупомянутые мутации ассоциированы с более благоприятным прогнозом [18]. В опухолях с мутациями в гене *IDH1*, как правило, обнаруживают мутации в гене-онкосупрессоре *TP53* (типично для астроцитом) или коделецию 1p/19q (характерный признак олигодендроглиом). Мутации в гене *IDH2* являются редкой находкой (обнаруживаются в $< 3\%$ глиом) и никогда не сочетаются с мутациями в гене *IDH1* [17]. Установлено, что ГБМ с диким типом *IDH1* имеют более злокачественный характер и характеризуются агрессивным течением болезни. Обнаружено, что мутации в гене *IDH1* довольно часто ассоциированы с мутациями в генах *TP53* и *ATRX* (см. ниже) и практически исключают наличие в опухолях мутаций/амплификаций генов тирозинкиназных рецепторов, в первую очередь *EGFR* [18] и *PDGFRA*.

Помимо мутаций в генах *IDH1/2*, различия в молекулярно-генетическом статусе глиом затрагивают мутации в генах *ATRX* и *TERT*, регулирующих длину, а также функциональную активность теломер. Показано, что мутации *TERT* обычно коррелируют с коделецией 1p/19q и мутацией *IDH1*. Данный паттерн наиболее характерен для первичных ГБМ и обнаруживается крайне редко у пациентов с астроцитомами grade 2–3, а также со вторичными ГБМ [19]. Напротив, для астроцитом и вторичных ГБМ характерны мутации *ATRX*, которые обычно коррелируют с мутациями *IDH1* и *TP53* [20]. Частота встречаемости мутации *ATRX* в астроцитомах существенно образом варьирует в зависимости от возраста пациентов и встречается у 1/3 детей с данным диагнозом, увеличиваясь с возрастом и достигая 70–80 % у взрослого населения. В то же время данная мутация крайне редко обнаруживается у пациентов с первичными ГБМ [21].

Мутации в гене *TP53* в большей степени характерны для вторичных ГБМ, хотя и могут выявляться у пациентов с первичными ГБМ (до 30 % случаев). Данные мутации и коделеция 1p/19q являются взаимоисключающими и при астроцитомах grade 1–2 обычно рассматриваются как неблагоприятный прогностический фактор, опосредующий более агрессивное течение заболевания [22] (рис. 1).

В глиомах также довольно часто выявляют aberrантную активацию сигнальных путей, регулируемых в первую очередь рецепторными тирозинкиназами. К ним относятся сигнальные пути рецепторов эпидермального фактора роста (*EGFR*), фактора роста эндотелия сосудов (*VEGFR*), рецептора тромбоцитарного фактора роста (*PDGFR*), фактора роста фибробластов (*FGFR*) и другие, которые определяют чувствительность опухолевых клеток к внешним и внутренним воздействиям (например, гипоксия, ХТ и ЛТ), а также стимулируют процессы неоангиогенеза, жизнеспособность и пролиферацию трансформированных

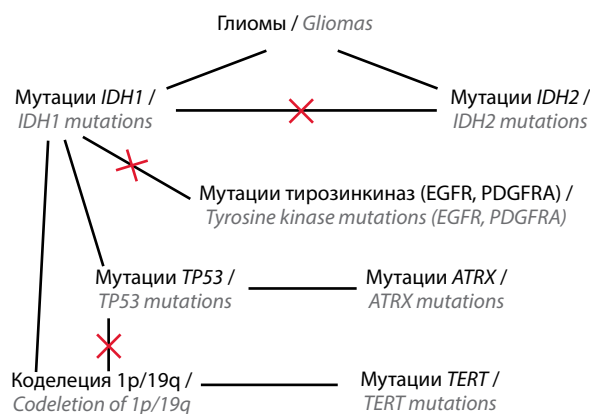


Рис. 1. Корреляционные связи составляющих молекулярно-генетического профиля глиом. Красными линиями зачеркнуты взаимоисключающие молекулярные маркеры. *EGFR* – рецептор эпидермального фактора роста; *PDGFRA* – рецептор тромбоцитарного фактора роста α .
Fig. 1. Correlational relationships within the molecular genetic profile of gliomas, with excluded molecular markers highlighted in red. *EGFR* – epidermal growth factor receptor; *PDGFRA* – platelet derived growth factor receptor α .

клеток. Активация вышеуказанных сигнальных путей, опосредованных рецепторными тирозинкиназами, безусловно, имеет большую прогностическую значимость и определяет оптимальный выбор при проведении таргетной терапии у пациентов с ГБМ (подробнее см. ниже) [2, 10]. Показано, что мутации в гене *EGFR* наиболее часто ассоциированы с анапластическими астроцитомами и первичными ГБМ. В противоположность этому aberrантная активация *PDGFRA*-опосредованного пути чаще наблюдается при вторичных ГБМ. Кроме того, в глиомах обнаруживаются мутации онкосупрессора *PTEN*, что также приводит к конститутивной активации сигнальных путей, в том числе сигнального пути Р13К/АКТ/мTOR (mTOR – мишень рапамицина млекопитающих), обеспечивающего высокий пролиферативный потенциал опухолевых клеток и ингибирование процессов их апоптоза. Характер мутаций *PTEN* при глиомах и ГБМ разнообразный. Точечные мутации и делеции, встречающиеся практически во всех подвидах глиом и ГБМ, наиболее часто детектируют при первичных и вторичных ГБМ (до 40 % случаев) [4].

Важно отметить, что особенности молекулярно-генетического статуса данных злокачественных новообразований (ЗНО) имеют большое значение как для их дифференциальной диагностики, так и для прогноза заболевания, определяя ответ на стандартную ХТ и ЛТ, а также на терапию таргетными препаратами.

Глиобластомы подразделяются на 4 молекулярно-генетических подтипа: пронеуронные, нейронные, классические и мезенхимальные [4]. Эта классификация основана на различиях в экспрессии генов, которые могут предсказать эффективность лечения. Молекулярно-генетическая характеристика и прогностическая значимость каждого подтипа ГБМ представлены в табл. 1.

Таблица 1. Основные молекулярно-генетические маркеры различных подтипов глиобластомы и характер их ответа на химиолучевую терапию

Table 1. Key molecular genetic markers associated with different subtypes of glioblastoma and their responses to radiotherapy and chemotherapy

Подтип глиобластом Glioblastoma subtype	Молекулярный маркер Molecular marker	Чувствительность к химиолучевой терапии Chemoradiation therapy sensitivity
Пронейронные Proneural	Мутации в генах <i>IDH1</i> , <i>p53</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>NKX2-2</i> и <i>PI3K</i> Mutations in <i>IDH1</i> , <i>p53</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>NKX2-2</i> and <i>PI3K</i> genes	Низкая Low
Нейронные Neural	Экспрессия <i>Fbxo3</i> , <i>Syt1</i> и <i>Gabra</i> <i>Fbxo3</i> , <i>Syt1</i> and <i>Gabra</i> expression	
Классические Classical	Экспрессия рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), отсутствие мутаций в генах <i>p53</i> и <i>IDH1</i> Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression, absence of mutations in <i>p53</i> and <i>IDH1</i> genes	
Мезенхимальные Mesenchymal	Гиперэкспрессия <i>CHI3L1</i> и <i>MET</i> , делеция <i>NF1</i> Hyperexpression of <i>CHI3L1</i> and <i>MET</i> , <i>NF1</i> deletion	Высокая High

Помимо ГБМ, другие глиомы grade 3 и 4 также характеризуются ядерной атипией, некрозом, васкулярной пролиферацией, плеоморфизмом, высокой митотической активностью, диффузной инфильтрацией, неблагоприятным прогнозом и наличием таких молекулярных маркеров, как мутации в генах *TP53*, *ATRX*, *IDH* (миссенс-мутация аргинина 132(1) или 172(2)), *PI3K*, *1p/19q*, *PTEN*, *RB*, *MGMT*, *CDKN2A* и гиперэкспрессия *HIF1-α*, *TERT*, *ELDT1*, *EGFR*, *PDGFRα* [1, 5, 6, 23–25]. Мутационный статус *IDH1/2* и *1p/19q* важен для классификации глиом [26]. Опухоли с наличием мутаций *IDH1/2* отличаются лучшими клиническими результатами, в то время как опухоли без этих мутаций представляют собой наиболее агрессивный тип глиом [26].

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМ

На данный момент стандартное лечение глиом высокой степени злокачественности включает максимально возможное хирургическое удаление опухоли с последующей ЛТ и ХТ с использованием темозоломида [27]. Однако общая выживаемость (ОВ) пациентов, получающих такое лечение, достигает 5 лет только в 7,2 % случаев [28]. Помимо стандартных схем ЛТ и ХТ в арсенале врача-онколога имеются таргетные препараты (ингибиторы рецепторных и нерцепторных тирозинкиназ и соответствующие моноклональные антитела (мАТ)), воздействующие на aberrантно активированные сигнальные пути в ГБМ. В настоящее время существует несколько методов ингибирования aberrантной активации рецепторных тирозинкиназ: 1) секвестрация лигандов нейтрализующими антителами (АТ); 2) нарушение взаимодействия между лигандами и соответствующими тирозинкиназными рецепторами посредством конкурентного блокирования последних специфическими моноклональными АТ и/или низкомолекулярными ингибиторами;

3) использование ингибиторов малой молекулярной массы для непосредственного блокирования киназной активности рецепторных тирозинкиназ и тирозинкиназ нисходящего сигнального каскада.

Ниже представлены некоторые сигнальные пути, активация которых в ГБМ играет большую роль в патогенезе заболевания и является предпосылкой для применения соответствующих таргетных препаратов как в качестве монотерапии, так и в комбинации со стандартными методами нехирургического лечения.

Рецептор эпидермального фактора роста. Аберрантная активация EGFR-сигнального пути является частым признаком ГБМ и выявляется почти в 60 % случаев [29, 30]. В подавляющем большинстве случаев определяются делеции во 2–7-м экзонах, кодирующих N-концевой фрагмент лигандсвязывающего внеклеточного домена EGFR 3-го варианта (EGFRvIII), что приводит к лиганднезависимой активации данного сигнального пути [31] и запускает PI3K- и MAPK-опосредованный сигналинг, способствуя усилению процессов клеточной пролиферации, ангиогенеза и ослаблению процессов апоптоза, обеспечивая тем самым резистентность ГБМ к проводимой терапии [32]. К аналогичному эффекту приводят делеции в 14–15-м экзонах *EGFR*, кодирующих EGFR 2-го варианта (EGFRvII) [33]. Миссенс-мутации *EGFR* встречаются не более чем в 10 % случаев ГБМ и сопровождаются более агрессивным течением заболевания и наихудшим прогнозом [34].

Несмотря на ранее полученные данные доклинических исследований, показавшие достаточную эффективность EGFR-ингибиторов в отношении клеток ГБМ *in vitro* и *in vivo*, результаты клинических испытаний до настоящего времени не являются обнадеживающими. Например, включение EGFR-ингибиторов эрлотиниба или сорафениба в стандартную схему терапии пациентов с ГБМ (темозоломид и ЛТ), а также

их использование в комбинации с ингибиторами ангиогенеза (бевацизумабом) не привело к существенному увеличению показателей ОБ и безрецидивной выживаемости (БРВ) [35–37]. Это могло явиться следствием неспособности эрлотиниба связываться с внеклеточным доменом EGFR. Клинический эффект гефитиниба был незначительно лучше: его применение приводило к увеличению показателей ОБ пациентов с ГБМ. Важно отметить, что у больных, которые получали такую терапию в неoadьювантном режиме, данный таргетный препарат накапливался в опухолевой ткани и вызывал дефосфорилирование EGFR, но, несмотря на это, не приводил к значительному уменьшению размеров опухоли [38]. Депатуксизумаб мафодотин (Depatux-M, АВТ-414), являющийся гуманизированным анти-EGFR мАТ, в комбинации с темозоломидом и ЛТ также не показал значимого увеличения показателей ОБ. В то же время БРВ была значительно выше у пациентов с EGFRvIII-вариантом ГБМ [39], что свидетельствует об избирательности действия этого препарата в отношении различных мутантных форм EGFR. Наилучшие результаты получены при использовании цетуксимаба, применявшегося в комбинации с бевацизумабом и иринотеканом [40, 41]. Однако данное анти-EGFR-АТ связывалось с соответствующими рецепторами в нормальных тканях, что неизбежно приводило к увеличению числа побочных эффектов, в первую очередь со стороны слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и кожных покровов. Нимотузумаб, являющийся гуманизированным анти-EGFR-мАТ, показал свою клиническую эффективность у пациентов с ГБМ при его комбинированном использовании с ХТ и ЛТ. Это подтверждает увеличение периодов ОБ и БРВ пациентов с ГБМ без метилирования *MGMT* [42]. Другие исследования также показали хорошие результаты лечения нимотузумабом в сочетании с химиолучевой терапией: отмечено увеличение вышеуказанных показателей [43, 44]. Результаты клинических испытаний дакомитиниба, являющегося необратимым ингибитором EGFR II поколения, ранее продемонстрировавшего свою эффективность в терапии пациентов с немелкоклеточным раком легкого, оказались также неубедительными в большинстве случаев ГБМ. Тем не менее детальный анализ мутационного профиля EGFR участников данного клинического испытания выявил наилучшие показатели ОБ и БРВ у пациентов с ГБМ с амплификацией *EGFR* без EGFRvIII-варианта. Аналогичные данные получены и при анализе когорт больных ГБМ, участвовавших в клинических исследованиях, посвященных оценке эффективности цетуксимаба [45], что свидетельствует о значительной молекулярно-генетической гетерогенности ГБМ, способной радикальным образом влиять на чувствительность опухоли к таргетным препаратам.

Рецептор фактора роста эндотелия сосудов. Известно, что для многих ЗНО, в том числе ГБМ, характерна активация процессов ангиогенеза вследствие гипер-

продукции проангиогенных факторов, таких как VEGF, PDGF и др. Стимуляция процессов ангиогенеза в ГБМ служит следствием гипоксии, являющейся частым спутником данного заболевания. Показано, что транслокация в ядро индуцированных гипоксией факторов 1α (HIF- 1α) и 1β (HIF- 1β) активирует VEGF-сигналинг и объясняет тем самым высокую васкуляризацию в данных опухолях [32, 46].

Рецептор тромбоцитарного фактора роста. Данный сигнальный путь также вовлечен в процессы ангиогенеза, регуляции клеточного цикла, миграции клеток и другие процессы, обуславливающие прогрессирование ЗНО. Активация PDGF-сигналинга также показана для ГБМ [47], его ингибирование приводило к их нейрональной дифференцировке и замедляло процессы туморогенеза [48], что делает весьма привлекательным использование ингибиторов данного сигнального пути в терапии ГБМ.

Рецептор фактора роста фибробластов. Данный сигнальный путь также регулирует процессы ангиогенеза как напрямую, так и опосредованно, активируя VEGFR-сигнальный путь, и участвует в процессах репарации повреждений ДНК, определяя тем самым чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающей терапии (ХТ и ЛТ) [49–54]. Опухолевые клеточные линии глиом характеризуются повышенной экспрессией различных типов рецепторов FGFR [54], в то время как нокдаун даже одного из них существенно снижает скорость их пролиферации [55]. Экспрессия различных типов FGFR в глиомах существенным образом варьирует. Тем не менее высокий уровень экспрессии FGFR1 и FGFR2 коррелирует со степенью злокачественности и неблагоприятным прогнозом [56, 57]. Имеются отдельные сообщения о наличии у пациентов с ГБМ слитных генов *TACC-FGFR1* и *TACC-FGFR3*, что является крайне редким событием, взаимоисключающим амплификацию *EGFR*. Наличие таких слитных генов приводит к продукции слитных белков, обладающих аутокаталитической тирозинкиназной активностью [58]. Данные об эффективности селективных FGFR-ингибиторов в терапии пациентов с ГБМ до настоящего времени отсутствуют, а клинические исследования находятся на начальной стадии. В настоящее время проводятся клинические испытания I и II фаз по изучению результативности применения селективных ингибиторов FGFR1-3 AZD4547 и BGJ398 (NCT028224133 и NCT01975701 соответственно) у пациентов с вторичными ГБМ, у которых выявлены мутации *TACC-FGFR1*, *TACC-FGFR3*, а также активирующие мутации первых трех типов *FGFR* и дикий тип *IDH1*. Ингибитор BGJ398 уже имеет коммерческое название – инфигратиниб – и используется в терапии некоторых ЗНО, имеющих активирующие мутации одного из типов рецепторов (например, холангиокарцином). Аналогичные критерии включения в исследование выбраны и для пациентов, участвующих в клинических испытаниях I–II фазы другого необратимого

FGFR-ингибитора – TAS-120 (NCT02052778) [59]. С учетом высокого уровня экспрессии FGFR на многих клетках ЦНС, большой роли FGFR-сигнального пути в поддержании их жизнеспособности, а также внутриопухолевой гетерогенности экспрессии FGFR при ГБМ результаты вышеуказанных клинических испытаний FGFR-ингибиторов, использованных в качестве монотерапии, будут крайне любопытными. Кроме того, поскольку FGFR1 является важным регулятором жизнеспособности стволовых раковых клеток [60] и определяет радиочувствительность ГБМ [61], дальнейшее применение соответствующих селективных ингибиторов в комбинации с химиопрепаратами и/или ЛТ может существенно улучшить прогноз заболевания и уменьшить частоту развития рецидивов ГБМ.

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа.

Показано, что активация сигнального пути рецептора инсулиноподобного фактора роста 1-го типа (IGF-1R) усиливает процессы пролиферации и миграции клеток глиом. Также имеются данные, свидетельствующие о корреляции уровня экспрессии данного рецептора с прогрессированием заболевания [62]. Показано, что гиперэкспрессия IGF-1R в ГБМ является неблагоприятным прогностическим признаком и коррелирует со снижением ОВ и БРВ, а также резистентностью к темозоломиду [63].

Помимо активации рецепторных тирозинкиназ в ГБМ также выявляют признаки активации/гиперэкспрессии нерецепторных тирозинкиназ, осуществляющих трансдукцию сигнала внутрь клеток посредством сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, JNK, SRC, JAK и STAT, описание которых не входит в задачу настоящего обзора и доступно в соответствующей литературе [64–69].

Таким образом, несмотря на то, что ЛТ и ХТ являются наиболее частыми постхирургическими методами лечения глиом, их терапевтическая активность невысока, а длительное применение сопряжено с высокой частотой развития побочных эффектов и имеет ряд ограничений. Включение в существующие схемы стандартной терапии ГБМ таргетных препаратов эффективно лишь для узких когорт пациентов, имеющих вышеуказанные особенности молекулярно-генетического статуса опухоли. Помимо этого, к причинам недостаточной эффективности названных методов терапии ГБМ следует отнести высокую инфильтрацию глиом, внутриопухолевую и межопухолевую гетерогенность, наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и иммуносупрессивное микроокружение [70]. Наличие последнего фактора, по мнению ряда исследователей, является одним из основных механизмов, определяющих неблагоприятное течение заболевания. В связи с вышеизложенным существуют различные подходы к коррекции иммунологических нарушений у пациентов с ГБМ, которые во многом имеют сходство с иммунокорректирующими мероприятиями при других онкологических заболеваниях.

На протяжении длительного времени ЦНС рассматривалась в качестве одного из примеров иммунологически привилегированных систем вследствие наличия ГЭБ, обуславливающего присутствие в головном мозге иммунокомпетентных, в том числе антигенпрезентирующих, клеток в крайне незначительных количествах. Данная точка зрения в последние годы подверглась существенному пересмотру: показано проникновение в ЦНС активированных лимфоцитов, что подтвердило факт активного взаимодействия иммунной системы и ЦНС. Кроме того, следует учитывать, что различные патологические процессы в ЦНС, в том числе опухолевые, сопровождаются повышением проницаемости ГЭБ за счет гиперпродукции противовоспалительных цитокинов, что способствует созданию оптимальных условий для хемотаксиса иммунокомпетентных клеток непосредственно в опухоль. Несмотря на то, что по сравнению с другими солидными опухолями при ГБМ обычно не обнаружено высокой инфильтрации Т- и НК-клеток (НК – естественные киллеры), в настоящее время активно разрабатываются новые подходы и стратегии по стимуляции иммунной системы при различных разновидностях ЗНО головного мозга [8, 9].

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИММУНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ

В настоящее время выделяют 4 основных вида иммунотерапии (ИТ) злокачественных глиом:

- 1) ИТ с использованием ингибиторов контрольных точек (ИКТ) иммунного ответа;
- 2) иммуномодулирующую цитокинотерапию (системная терапия, ЛАК-терапия (ЛАК – лимфокин-активированные киллеры));
- 3) адоптивную ИТ (пептидные и дендритные вакцины);
- 4) CAR-T-терапию (CAR – химерный антигенный рецептор) (рис. 2).

Иммунотерапия с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа

Данный вид ИТ заключается в ингибировании выделяемых глиомами факторов, подавляющих воздействие иммунной системы человека на опухолевые клетки. Основными молекулярными мишенями в данном случае являются молекулы рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1)/лиганда PD-L1 и CTLA-4.

Лиганд PD-L1 – трансмембранный гликопротеин, который при нормальных условиях выделяется макрофагами, Т- и В-клетками, дендритными и эпителиальными клетками при воспалительном процессе [71–75]. Также PD-L1 продуцируется опухолевыми клетками как защитный механизм для избегания атаки иммунными клетками организма [75]. Он выполняет проопухолевую функцию, связываясь с рецепторами и активируя сигнальные пути (MAPK, WNT, Hedgehog, транскрипционный ядерный фактор κB (NF-κB), JAK/STAT, PI3K/AKT), повышающие выживаемость раковых клеток, что ведет к росту опухоли и развитию болезни [75, 76].

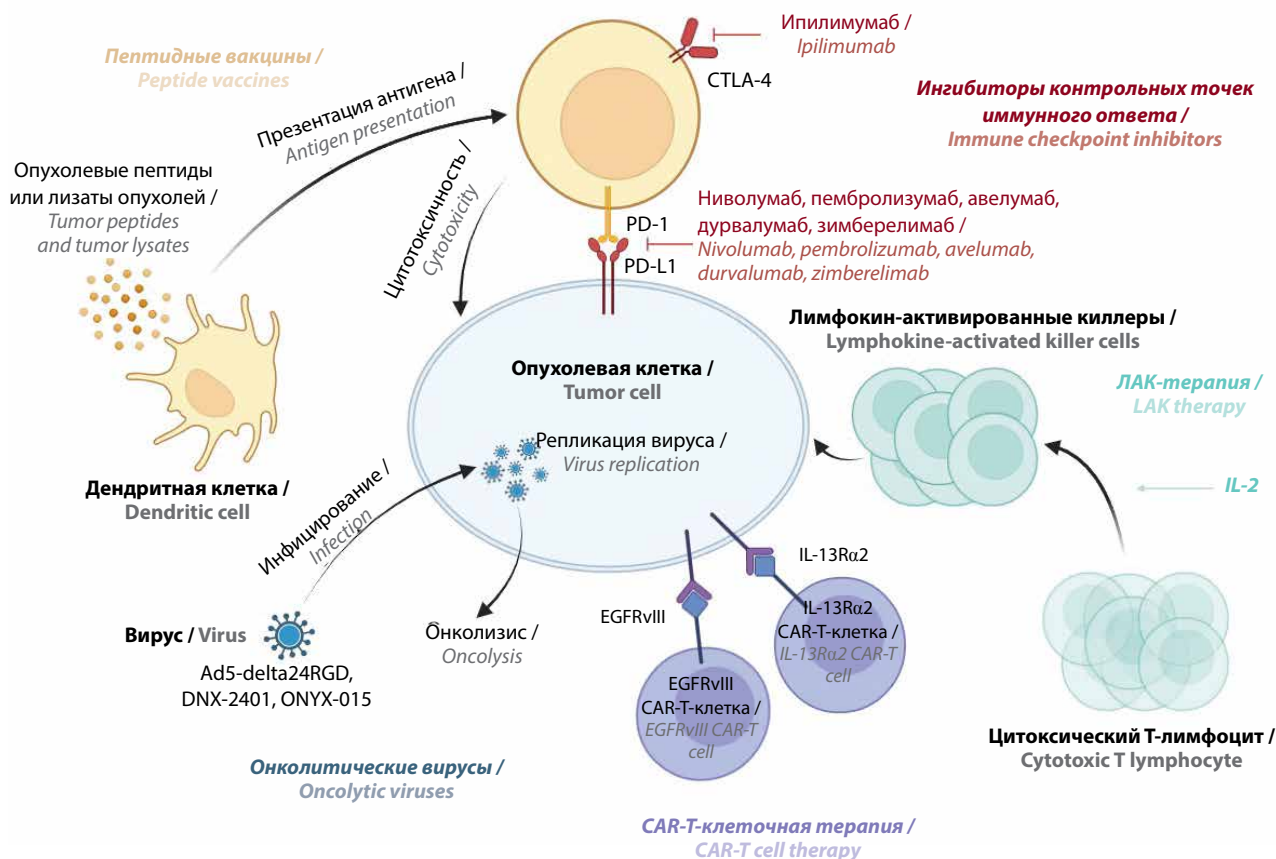


Рис. 2. Современные методы иммунотерапии злокачественных глиом: терапия с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, онколитических вирусов и пептидных вакцин, ЛАК-терапия (цитокинотерапия), CAR-T-иммунотерапия (CAR – химерный антигенный рецептор). EGFRvIII – рецептор эпидермального фактора роста 3-го варианта; IL-13Ra2 – интерлейкин 13Ra2; PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; IL-2 – интерлейкин 2
Fig. 2. Current strategies for malignant gliomas immunotherapy: immune checkpoint inhibitors, cancer vaccines and oncolytic viral therapy, LAK-therapy, CAR-T-immunotherapy (CAR – chimeric antigen receptor). EGFRvIII – epidermal growth factor receptor variant III; IL-13Ra2 – interleukin 13Ra2; PD-1 – receptor for programmed cell death 1; PD-L1 – ligand of the receptor for programmed cell death 1; IL-2 – interleukin 2

Результаты исследований показали, что экспрессия PD-L1 может быть индуцирована следующими факторами:

- интерферон (INF) γ связывается с рецепторами IFNGR, происходит активация JAK/STAT-сигнального пути, что приводит к активации IRF-1 и повышает уровень экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках;
- снижение экспрессии PTEN вызывает активацию PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути, который увеличивает экспрессию PD-L1;
- повышенное метилирование промотора ДНК приводит к усилению экспрессии PD-L1;
- потеря функции нейрофибромина NF-1 коррелирует с гиперэкспрессией PD-L1;
- фактор дифференцировки роста (GDF-15) стимулирует экспрессию PD-L1 через Smad2/3-сигнальный путь в клетках ГБМ [76–82].

Наиболее высокий уровень экспрессии PD-L1 наблюдается в мезенхимальных глиомах, что делает их более чувствительными к лечению, в то время как наименьшая экспрессия PD-L1 обнаруживается у пронейронных глиом [76]. Более того, PD-L1 стимулирует иммуносупрессию и изменяет микроокружение опухоли [77].

Одним из первых препаратов, ингибирующих PD-L1, стал ниволумаб, который представляет собой моноклональные иммуноглобулины G (IgG), воздействующие на рецептор PD-1 и блокирующие его связывание с соответствующими лигандами (PD-L1 и PD-L2) [83]. Однако результаты некоторых исследований показали, что в случае вторичных ГБМ терапевтический эффект этого препарата не превышает эффекта другого таргетного препарата – бевацизумаба, поскольку медиана ОБ пациентов с ГБМ при использовании как ниволумаба, так и бевацизумаба составила около 10 мес [81, 84, 85].

В случае первичных ГБМ наиболее эффективным оказался ниволумаб в сочетании с ипилимумабом [86]. Использование комбинации ниволумаб + ЛТ + темозоломид в терапии первичных немиелиновых ГБМ с мутациями *MGMT* показало хорошие результаты, что стало основанием для планирования и проведения дальнейших клинических испытаний [87]. Тем не менее вышеуказанная комбинация препаратов не продемонстрировала эффективности и не оказала существенного влияния на ОВ пациентов с первичной миелиновой ГБМ с аналогичным с мутациями в гене *MGMT* [88].

Помимо ниволумаба другой таргетный препарат – пембролизумаб – также показал свою эффективность в лечении пациентов с ГБМ [89, 90]. Тем не менее данные о его эффективности неоднозначны. В частности, показано, что использование этого препарата как в отдельности, так и в комбинации с бевацизумабом не приводит к значимому увеличению медианы ОВ пациентов со вторичными ГБМ [91]. У больных, не отвечающих на терапию, выявлены мутации *P TEN*, которые способствуют формированию иммуносупрессивного микроокружения опухоли [92]. Таким образом, противоречивые результаты могут быть обусловлены различиями в молекулярно-генетическом профиле опухолей [92].

Препараты авелумаб и дурвалумаб, являющиеся ингибиторами PD-L1, также были включены в исследования по изучению эффективности ИТ глиом.

В большинстве случаев не отмечено увеличение медианы ОВ пациентов с ГБМ, получавших данную терапию [93–96].

Другой молекулярной мишенью рассматриваемого вида ИТ является цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA-4), который является рецептором, связывающимся с молекулой B7 и блокирующим иммунный ответ посредством ингибирования процессов активации Т-клеток [96]. Принципы действия CTLA-4 и PD-1 схожи, однако лигандами CTLA-4 являются CD86 и CD80 [95]. CTLA-4 – гомолог CD28, но, в отличие от CD28, при связывании с B7 этот рецептор не продуцирует стимулирующий сигнал, который должен активировать Т-клетки [97]. CTLA-4 отличается от PD-L1 также и тем, что влияет на активацию регуляторных Т-клеток, в то время как воздействие PD-L1 на эти клетки неясно [96, 98–101]. Ингибитором CTLA-4 является ипилимумаб – моноклональное IgG-AT, блокирующее взаимодействие B7 и CTLA-4, что увеличивает активацию и пролиферацию Т-клеток [62]. Свойства этого препарата активно изучаются в целях определения его эффективности в лечении ГБМ. Показано, что терапия ГБМ с использованием ипилимумаба (в дозе 3 мг/кг каждые 3 нед) и бевацизумаба (в дозе 10 мг/кг каждые 2 нед) приводит к существенным изменениям в характере течения заболевания: у 31 % пациентов выявлен частичный ответ, у 31 % – стабилизация процесса, у 38 % – прогрессирование за-

Таблица 2. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа и их молекулярные мишени

Table 2. Immune checkpoint inhibitors and their molecular targets

Молекулярная мишень Molecular target	Препарат Drug	Источник/исследование Source/study
PD-1/PD-L1	Ниволумаб Nivolumab	[81, 83–88]
	Пембролизумаб Pembrolizumab	[89–92]
	Авелумаб Avelumab	[93–96]
	Дурвалумаб Durvalumab	
	Зимберелимаб Zimberelimab	NCT04656535
CTLA-4	Ипилимумаб Ipilimumab	[62, 63], NCT02311920, NCT02017717
CD366 (TIM-3)	Тоцилизумаб Tocilizumab	[102]
CD233 (LAG-3)	Урелумаб Urelumab	[103]
TIGIT	Тираголумаб, домваналимаб Tiragolumab, domvanalimab	[104–107], NCT04656535

болевания [63]. В настоящее время проводится несколько клинических испытаний, посвященных изучению эффективности ипилимумаба при ГБМ (NCT02311920, NCT02017717).

Помимо молекул PD-1/PD-L1, а также CTLA-4, роль которых в модуляции активности лимфоцитов при многих онкологических заболеваниях (в том числе ГБМ) доказана, в последнее время появились данные о ряде других молекул, экспрессирующихся на клетках опухоли и ее микроокружения и выполняющих аналогичную функцию. Их вполне резонно можно рассматривать в качестве перспективных терапевтических мишеней. К ним относят молекулы CD366, или TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein-3), CD233, или LAG-3 (lymphocyte activation gene-3), TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) domains) [102–105, 108].

Роль вышеуказанных молекул в формировании иммунологической толерантности при ЗНО показана в доклинических исследованиях. Например, использование нейтрализующих анти-TIGIT-АТ, применяемых в комбинации с анти-PD-1- или анти-PD-L1-АТ, приводило к существенному усилению действия последних в доклинических исследованиях на ксенографтных моделях рака кишечника, молочной железы и ГБМ, в то время как использование анти-TIGIT-АТ в виде монотерапии оказалось малоэффективным [106, 107]. В настоящее время активно проводятся клинические испытания по изучению результативности применения ингибиторов вышеуказанных молекул в терапии ряда онкологических заболеваний, в том числе ГБМ. Например, эффективность дованалимаба (AB154), являющегося Fab-фрагментом IgG1 к TIGIT, в комбинации с анти-PD-L1-ингибитором зимберелимабом в настоящее время оценивается в клиническом испытании, в которое вошли пациенты с вторичными ГБМ (NCT04656535). Эффективность данной комбинации таргетных препаратов в настоящее время оценивается и в отношении других ЗНО, включая распространенные и метастатические формы солидных опухолей различной локализации (NCT03628677), а также PD-L1-положительный рак легкого (NCT04262856).

Наиболее изученные ИКТ иммунного ответа и их молекулярные мишени представлены в табл. 2.

Иммуномодулирующая цитокинотерапия (системная, ЛАК-терапия)

Системная цитокинотерапия. Цитокинотерапия является одним из самых распространенных методов коррекции иммунологических нарушений при многих заболеваниях, в том числе онкологических. Несмотря на относительную простоту и доступность данного подхода, широкое использование этой терапии имеет ряд существенных ограничений и сопровождается развитием побочных эффектов. Одним из наиболее серьезных

нежелательных явлений является септикоподобный синдром, развивающийся вследствие дистантного действия цитокинов, приводящих к системной активации иммунной системы вследствие каскадного запуска продукции цитокинов клетками различного происхождения и последующего развития системной воспалительной реакции [109, 110].

Имеются многочисленные данные, подтверждающие иммуносупрессивное действие ГБМ посредством синтеза и продукции различных иммуносупрессивных молекул и цитокинов – интерлейкина (IL) 6, MCP-1, VEGF, CCL-2, IDO, HIF-1 α , PD-L1 и др. [64, 70].

Некоторые из вышеназванных цитокинов оказывают негативное влияние на функциональную активность миелоидных клеток (макрофагов и моноцитов), снижают фагоцитарный индекс и функциональную активность Т-клеток, нарушают созревание дендритных клеток, а также могут вызывать запрограммированную клеточную гибель (апоптоз) лимфоцитов [64, 70]. Цитокины оказывают либо иммуностимулирующий, либо иммуносупрессивный эффект в зависимости от микроокружения опухоли [111]. Наибольшая противоопухолевая активность показана в отношении цитокинов IL-2, IL-4, IL-13 и трансформирующего фактора роста (TGF) β [111–121].

Интерфероны также принимают участие в формировании адекватного противоопухолевого иммунного ответа. На основе происхождения и функций INF подразделяются на 3 типа. К 1-му типу относятся INF- α , INF- β , INF- ϵ , INF- κ и INF- Ω , ко 2-му – INF- γ , к 3-му – INF- λ [122, 123]. Интерфероны 1-го типа стимулируют клетки иммунной системы, подавляют рост опухолевых клеток и инициируют их апоптоз, стимулируют экспрессию белков, которые препятствуют делению опухолевой клетки в фазе G [124]. Интерфероны 2-го типа участвуют в регуляции количества Т-клеток и увеличении количества белков, играющих роль в иммунном ответе [125]. По сравнению с INF 1-го типа INF- γ выполняет иммуномодулирующую функцию вместо противовирусной или противоопухолевой. Функции INF 3-го типа схожи с функциями INF 1-го типа. Результаты двух исследований II фазы продемонстрировали, что использование INF- α (0,5 мкг) в сочетании с темозоломидом (в дозе 150–200 мгм⁻²/день на протяжении 5 мес) не показало увеличения медианы ОВ пациентов [126]. Данные, полученные в ходе еще одного исследования I фазы с применением INF- β и темозоломида, продемонстрировали увеличение показателей ОВ пациентов с первичными ГБМ до 17,1 мес и пациентов со вторичными ГБМ – до 14,6 мес [127].

Трансформирующий фактор роста β 2. Повышенная экспрессия TGF- β 2 наблюдается в 90 % глиом высокой степени злокачественности, ее уровень коррелирует с прогрессированием заболевания [128]. Функции TGF- β 2 заключаются в ингибировании активации иммунных клеток, блокировании противоопухолевого эффекта и иммуносупрессии. В связи с вышеизложенным

интересными являются данные по изучению эффективности трабедерсена (AP-12009) — синтетического антисмыслового олигодеоксинуклеотида, комплементарного с матричной РНК TGF- β 2 [129]. Результаты клинических исследований показали, что включение этого препарата в стандартные схемы лечения ГБМ благоприятно сказывается на ОВ пациентов и улучшает ответ на терапию [130].

Следует подчеркнуть, что эффективность цитокиновой терапии у пациентов с ГБМ весьма ограничена. Это обусловлено в первую очередь коротким периодом полувыведения цитокинов и невозможностью достижения их оптимальных концентраций в головном мозге без существенного повышения вводимых концентраций. Последнее чревато развитием серьезных системных побочных эффектов, среди которых следует выделить цитокиновый шторм, напоминая картину септикоподобного шока, а также аутоиммунные реакции.

ЛАК-терапия. Для минимизации вышеперечисленных побочных эффектов сделаны попытки адаптировать цитокинотерапию и активировать аутологичные лимфоциты *ex vivo* с помощью различных цитокинов, в первую очередь IL-2, для их последующего введения пациенту. Данный подход получил название ЛАК-терапии. Лимфокин-активированные киллеры (ЛАК) стали первыми клетками, используемыми для адоптивной ИТ ГБМ. Их комбинация с IL-2 показала положительные результаты [131–133]. Однако в связи с появлением более эффективных методов лечения воздействие ЛАК на ГБМ в последнее время активно не изучается.

Адоптивная иммунотерапия

Данный подход основан на индукции эффективного противоопухолевого иммунитета у пациентов с ГБМ. Решение этой задачи предполагает создание противоопухолевых вакцин, направленных на стимуляцию иммунных эффекторных клеток, а также на усиление их инфильтрации в опухоли, облегчение распознавания ими опухолевых антигенов и последующей элиминации опухолевых клеток посредством их гибели по механизму апоптоза.

К основным методам активной ИТ ГБМ в настоящее время относят применение пептидных вакцин, вакцин, полученных с использованием аутологичных дендритных клеток, а также (с определенной долей условности) онколитических вирусов. В результате использования вышеперечисленных терапевтических подходов в организме формируется длительный антигенспецифический иммунный ответ [108].

Пептидные вакцины. Данный тип вакцин создается на основе нуклеиновых кислот, вводимых в виде сегмента генов, ДНК или РНК, кодирующих определенные опухолевые антигены, что приводит к индукции противоопухолевого иммунного ответа. РНК-вакцины имеют ярко выраженные преимущества по сравнению с ДНК-вакцинами, обусловленные их способностью

к прямой трансляции опухолевых антигенов, а также более высокой безопасностью, однако они имеют и существенные недостатки, связанные с высокими чувствительностью РНК к нуклеазам и скоростью дегградации. Несмотря на очевидную антигенность ГБМ и экспрессию довольно большого количества мутантных молекул, способных стать мишенями для иммунной системы (например, EGFR, NF1, PDGFRA, PTEN, TERT, RB1, TP53, IDH1, PIK3CA и PIK3R1 и др.), количество пептидных вакцин весьма ограничено [134, 135]. В качестве примера пептидной вакцины для ИТ ГБМ можно привести вакцину риндопепимут (RINTEGA®, CDX-110), направленную на генерацию иммунного ответа против мутантной формы рецептора EGFRvIII, экспрессия которого обнаруживается примерно у 1/3 пациентов с первичными ГБМ [136].

Результаты клинических испытаний (NCT01480479) показали эффективность комбинированного использования данной вакцины в сочетании с темозоломидом, что приводило к увеличению выживаемости пациентов без прогрессирования (6,4 мес) и медианы ОВ до 15,2 мес [137, 138]. Тем не менее клинические данные неоднозначны; имеются свидетельства о неэффективности вышеуказанной комбинированной терапии. Более того, производитель данной вакцины (Celldex Therapeutics, Inc., США) остановил проведение клинических испытаний III фазы по причине отсутствия значимых различий в ОВ и БРВ между контрольной группой пациентов с ГБМ и исследуемой, получающей риндопепимут [139].

На более ранней стадии разработки находится вакцина IMA950, которая состоит из 11 опухолевых-специфических пептидов, ассоциированных с ГБМ [140]. Ожидалось, что формирование поликлонального иммунного ответа будет более эффективным, что подтвердили результаты клинических испытаний, показавшие увеличение медианы ОВ до 15,3 мес и выживаемости без прогрессирования до 9 мес в группе пациентов, получавших терапию данной вакциной [140]. Еще одним примером перспективной пептидной вакцины, используемой для лечения ГБМ, является вакцина NoeVax, содержащая до 20 длинных пептидов, разделенных на 4 пула (по 3–5 пептидов на пул). Ее эффективность оценивается у взрослых пациентов с MGMT-неметилированными первичными ГБМ (NCT02287428). Также показана высокая иммуногенность пептидов данной вакцины, что проявлялось в существенном усилении продукции INF- γ лимфоцитами периферической крови больных [141].

Дендритные вакцины. Еще один подход для активной стимуляции антигенспецифического противоопухолевого иммунного ответа основан на использовании так называемых дендритных вакцин, принцип действия которых заключается в получении от пациента с ЗНО дендритных клеток и их последующей обработке специфическими антигенными детерминантами и обратном введении в организм больного, от которого

были ранее получены клетки-предшественники дендритных клеток (чаще всего моноциты периферической крови) [142].

Таким образом, дендритные вакцины могут содержать различный антигенный материал, источником которого являются как хорошо известные опухолевые пептиды, так и лизаты опухолей, а также ДНК и РНК. В настоящее время имеются данные о большом количестве проходящих и уже завершившихся клинических испытаний по оценке безопасности и эффективности разных дендритных вакцин для лечения ГБМ (NCT02049489, NCT01808820, NCT01902771 и др.), результаты некоторых из них показали значимое увеличение медианы ОВ пациентов с первичными ГБМ [142–148].

CAR-T-клеточная терапия

В настоящее время CAR-T-клеточная терапия является одним из наиболее перспективных и быстро развивающихся методов ИТ ЗНО [149]. Основным принципом данного подхода является получение Т-клеток от пациента, их иммуноредактирование с целью производства химерных рецепторов, способных распознавать трансформированные клетки [150]. После пролиферации *in vitro* полученные ранее Т-клетки вводятся обратно больному для запуска противоопухолевого ответа [151]. Наибольшая эффективность CAR-T-клеточной терапии показана при онкогематологических заболеваниях. Например, продемонстрирована высокая эффективность применения анти-CD19 CAR-T-клеток в лечении пациентов с рефрактерными формами лимфом, что приводило к полной регрессии заболевания и сохранению терапевтического эффекта на протяжении более 4 лет [152]. Успехи использования данного подхода к терапии ГБМ и других солидных опухолей до настоящего времени гораздо более скромные. Это обусловлено многими факторами, среди которых следует выделить: 1) отсутствие и/или утрату специфических опухолевых антигенов и гетерогенность опухоли [153]; 2) наличие ГЭБ; 3) иммуносупрессивное микроокружение ГБМ, возникающие вследствие гиперпродукции отдельных цитокинов (например, IL-6, IL-10 и TGF- β 2), наличие в опухоли регуляторных клеток (Tregs), опухоль-ассоциированных макрофагов, фибробластов, миелоидных клеток-супрессоров (MDSC), а также лигандов ИКТ иммунного ответа, ингибирующих активность цитотоксических Т-клеток [154–157].

Основными молекулярными мишенями, рассматриваемыми в настоящее время при разработке данной стратегии ИТ ГБМ, являются рецепторы IL-13, человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2), а также EGFRvIII – наиболее распространенная мутация *EGFR*, которая встречается в 30 % случаев глиом высокой степени злокачественности, особенно в мультиформных ГБМ [157–162]. К перспективным, но гораздо менее изученным

молекулярным мишеням для CAR-T-терапии ГБМ также относят GD2, MUC1, CD147 и EphA2.

Эффективность и безопасность генно-модифицированных аутологичных и аллогенных Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности IL-13R α 2, оценивалась в нескольких клинических испытаниях (NCT01975701, NCT02208362, NCT00730613, NCT01082926); в ряде случаев показаны положительные результаты данной терапии. Например, у некоторых пациентов, участвовавших в клиническом испытании I фазы NCT02208362, интракраниальное введение модифицированных лимфоцитов приводило к частичной (а в 1 случае – к полной) регрессии внутримозговых поражений спустя 6–7 мес после начала терапии. Тем не менее, даже несмотря на успешность данного лечения, у отдельных больных, практически во всех случаях спустя 7–8 мес после его начала, наблюдались признаки рецидивирования опухоли, что, по всей видимости, обусловлено изменениями молекулярной мишени и/или снижением уровня экспрессии IL-13R α 2 в опухолевой ткани [159]. Следует отметить, что во всех случаях использования данного подхода у пациентов не было признаков повреждения нормальной ткани и серьезных побочных эффектов, а благодаря наличию определенных репортерных конструкций в генетически модифицированных Т-клетках удалось подтвердить повышение накопления данных лимфоцитов в опухолевой ткани с помощью позитронной эмиссионной томографии [163].

Результаты исследования эффективности и безопасности применения CAR-T-клеток, экспрессирующих на своей поверхности Her2neu, также представлены в современной научной литературе. Результаты клинического испытания I фазы NCT01109095, в котором участвовали 17 пациентов с прогрессирующими ГБМ, показали умеренно положительный эффект введения HER2-CAR-T-клеток, который оценивался по результатам магнитно-резонансной томографии головного мозга спустя 6 нед после первой инфузии. У 1 больного отмечен частичный ответ на терапию, а у 7 наблюдались признаки стабилизации заболевания в течение 8–29 мес. Медиана ОВ этих 8 пациентов составила 24 мес после установления диагноза и 11 мес после начала лечения. Стоит отметить, что данная терапия не сопровождалась развитием серьезных побочных эффектов [164].

Эффективность ретровирусно-трансдуцированных EGFRvIII CAR-T-клеток при ГБМ оценивалась в нескольких клинических испытаниях. В пилотном клиническом испытании NCT01454596 не удалось доказать их клинический эффект, поскольку у большинства пациентов (у 16 из 18), получавших комбинированную ХТ циклофосфамидом и флударабином в сочетании с инфузиями EGFRvIII CAR-T-клеток, отмечено прогрессирование опухолевого процесса менее чем через 3 мес после начала CAR-T-терапии. Как и в других ранее описанных случаях, стремительное уменьшение эффективности инфузий EGFRvIII

CAR-T-клеток могло быть обусловлено потерей или снижением экспрессии EGFRvIII в резецированных опухолях. Помимо этого, данный вид терапии сопровождался развитием серьезных побочных эффектов преимущественно неврологического характера, а также со стороны органов дыхательной системы [161]. К настоящему времени имеются результаты клинических исследований I фазы по изучению эффективности и безопасности генно-модифицированных T-клеток, воздействующих на другие типы вышеупомянутых рецепторов, а именно GD2 (NCT03252171, NCT04099797), CD147 (NCT04045847) и EphA2 (NCT02575261). В подавляющем большинстве случаев отмечены кратковременный терапевтический эффект и умеренная токсичность.

Таким образом, несмотря на разнообразие модификаций и способов доставки CAR-T-клеток, на сегодняшний день результаты клинических испытаний по оценке эффективности CAR-T-терапии при ГБМ не доказали их эффективность в достижении выраженного и продолжительного противоопухолевого эффекта. Поэтому в качестве наиболее перспективных подходов дальнейшего использования CAR-T-клеток в терапии пациентов с ГБМ рассматривается их использование в составе комбинированной терапии, направленной в том числе на устранение основных факторов, способных нивелировать эффективность CAR-T-клеток в ГБМ. Одним из таких подходов является комбинирование CAR-T-терапии с применением ИКТ иммунного ответа (например, PD-1), что может поддержать численность и сохранить функциональную активность модифицированных T-клеток в опухолевой ткани в течение более длительного времени. Например, в настоящий момент проводятся клинические испытания по изучению безопасности и эффективности EGFRvIII CAR-T-клеток, используемых в комбинации с пембролизумабом (NCT03726515). Аналогичные исследования выполняются в отношении IL-13R α 2 CAR-T-клеток, применяемых в комбинации с ниволумабом и/или ипилимумабом (NCT04003649).

Существенным ограничивающим фактором подобных исследований является увеличение частоты побочных эффектов, в том числе обусловленных гиперактивацией иммунной системы и выбросом цитокинов. В качестве альтернативного подхода, позволяющего избежать негативных последствий применения ИКТ иммунного ответа, разработана поливалентная генетическая конструкция T-клеток, воздействующая на 3 основных типа рецепторов опухолевых клеток: HER2, IL-13R α 2- и EphA2. В настоящее время данные исследования находятся на доклинической стадии. Показано, что генно-модифицированные T-клетки, экспрессирующие сразу 3 антигенспецифичных фрагмента

HER2, IL-13R α 2- и EphA2, обладают высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток *in vitro*. Это подтверждается результатами исследований на ортотопических моделях опухолей [163]. Для повышения персистенции CAR-T-клеток в опухолевой ткани и увеличения таким образом продолжительности эффекта от CAR-T-терапии также используют методы коэкпрессии модифицированными клетками иммунорегуляторных цитокинов, например IL-15. Показано, что секреция IL-15 улучшает персистенцию IL-13R α 2 CAR-T-клеток и приводит к усилению их противоопухолевой активности *in vivo*. Тем не менее достигнутый положительный эффект был непродолжительным [165].

ДРУГИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМ

Еще одним перспективным методом терапии глиобластом является использование онколитических вирусов для разрушения раковых клеток [23]. Начальный этап исследований по изучению возможностей вирусного онколиза ГБМ связан с вирусами паротита и рекомбинантного вируса герпеса. В настоящее время описано довольно большое количество механизмов взаимодействий онколитических вирусов с раковыми клетками, а также охарактеризованы отдельные группы вирусов-кандидатов, разрабатываемых на основе как РНК-, так и ДНК-содержащих вирусов. Например, результаты доклинических исследований аденовирусных конструкций (Ad5-delta24RGD или DNX-2401) показали их высокую эффективность в сочетании с ЛТ, что привело к значительному уменьшению размеров ГБМ у подавляющего числа экспериментальных животных [166]. Последующие данные, полученные в ходе клинических исследований I фазы, также показали существенный положительный терапевтический эффект DNX-2401, что проявлялось в уменьшении размеров ГБМ более чем у 95 % пациентов и сопровождалось значительным (более 3 лет) увеличением показателей ОВ более чем у 20 % больных [167]. Результаты исследований с использованием другого аденовируса – ONYX-015 – также были положительными: наблюдалось увеличение показателей ОВ и БРВ пациентов с ГБМ, что не сопровождалось развитием серьезных побочных эффектов [168].

Помимо использования аденовирусов применение вирусов простого герпеса и полиомиелита также рассматривается в качестве перспективного подхода к онколизису при ГБМ [169]. Результаты клинических испытаний I фазы, в ходе которых изучалась эффективность вышеуказанных вирусов, тоже продемонстрировали увеличение показателей ОВ пациентов с ГБМ [170, 171].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, современные методы лечения ГБМ диктуют необходимость учета основных клинико-морфологических и молекулярно-генетических особенностей опухолей, в том числе маркеров иммунологического статуса как ГБМ, так и пациента. Разрабатываемые подходы к коррекции иммунологических нарушений у больных с ГБМ, безусловно, должны учитывать типовые иммунологические характеристики опухолей и их микроокружения. В ряде случаев они являются примерами персонализированной терапии

ГБМ (например, использование пептидной или дендритной вакцины).

На наш взгляд, большинство представленных в обзоре подходов к ИТ ГБМ крайне перспективны и способны улучшить прогноз данного заболевания. Достижение оптимального терапевтического эффекта ИТ ГБМ возможно при ее сочетании со стандартными методами, а в ряде случаев при ее комбинированном применении с таргетными препаратами, ингибирующими aberrantную активацию сигнальных путей в опухолевых клетках.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Barh D., Carpi A., Verm M. et al. Cancer biomarkers: minimal and noninvasive early diagnosis and prognosis. NY: CRC Press, 2014.
- Louis D.N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 2021;23(8):1231–51. DOI: 10.1093/neuonc/noab106
- Кобяков Г.Л., Бекяшев А.Х., Голанов А.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению первичных опухолей центральной нервной системы. *Злокачественные опухоли* 2018;8(3):83–99. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-83-99
- Kobyakov G.L., Bekyashev A.Kh., Golanov A.V. et al. Practical recommendations for the drug treatment of primary tumors of the central nervous system. *Zlokachestvennyye opuholi = Malignant Tumors* 2018;8(3):83–99. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-83-99
- Verhaak R.G., Hoadley K.A., Purdom E. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17(1):98–110. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.12.020
- Ma R., Taphoorn M.J., Plaha P. Advances in the management of glioblastoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2021;92(10):1103–11. DOI: 10.1136/jnnp-2020-325334
- Генс Г.П., Санников В.Д., Милейко В.А., Лебедева А.А. Глиобластома: молекулярно-генетический портрет и современные терапевтические стратегии лекарственного лечения. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(3):60–76. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-60-76
- Gens G.P., Sanikovich V.D., Mileyko V.A., Lebedeva A.A. Glioblastoma: a molecular genetic portrait and modern therapeutic strategies for drug treatment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(3):60–76. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-60-76
- Rocha Pinheiro S.L., Lemos F.F.B., Marques H.S. et al. Immunotherapy in glioblastoma treatment: Current state and future prospects. *World J Clin Oncol* 2023;14(4):138–59. DOI: 10.5306/wjco.v14.i4.138
- Agosti E., Zeppieri M., De Maria L. et al. Glioblastoma immunotherapy: a systematic review of the present strategies and prospects for advancements. *Int J Mol Sci* 2023;24(20):15037. DOI: 10.3390/ijms242015037
- Coxon A.T., Johans T.M., Dunn G.P. An innovative immunotherapy vaccine with combination checkpoint blockade as a first line treatment for glioblastoma in the context of current treatments. *Mo Med* 2020;117(1):45–9.
- Коновалов Н.А., Асютин Д.С., Шайхаев Е.Г. и др. Молекулярные биомаркеры астроцитом головного и спинного мозга. *Acta Naturae (русскоязычная версия)* 2019;11;2(41):17–27.
- Kononov N.A., Asyutin D.S., Shayhaev E.G. et al. Molecular biomarkers of brain and spinal cord astrocytomas. *Acta Naturae* 2019;11;2(41):17–27. (In Russ.).
- Кузнецова Н.С., Гурова С.В., Гончарова А.С. и др. Современные подходы к терапии глиобластомы. *Южно-Российский онкологический журнал* 2023;4(1):52–64. DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-6
- Kuznetsova N.S., Gurova S.V., Goncharova A.S. et al. Modern approaches to glioblastoma therapy. *Yuzhno-Rossiiskij onkologicheskij zhurnal = South Russian Journal of Cancer* 2023;4(1):52–64. (In Russ.). DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-6
- Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А. и др. Современные достижения CAR-T иммунотерапии для лечения глиобластомы. *Медицинская иммунология* 2021;23(3):483–96. DOI: 10.15789/1563-0625-RAI-2111
- Timofeeva S.V., Sitkovskaya A.O., Novikova I.A. et al. Recent achievements in CAR-T cell immunotherapy for glioblastoma treatment. *Medical Immunology (Russia)* 2021;23(3):483–96. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-RAI-2111
- Yang H., Ye D., Guan K.L. et al. *IDH1* and *IDH2* mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5562–71. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1773
- Dang L., White D.W., Gross S. et al. Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009;462(7274):739–44. DOI: 10.1038/nature08617
- Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K. et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510–22. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.03.017
- Yan H., Parsons D.W., Jin G. et al. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765–73. DOI: 10.1056/NEJMoa0808710
- Huse J.T., Aldape K.D. The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma. *Clin Cancer Res* 2014;20(22):5601–11. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0831
- Zou P., Xu H., Chen P. et al. *IDH1/IDH2* mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis. *PLoS One* 2013;8(7):e68782. DOI: 10.1371/journal.pone.0068782
- Anderson M.D., Gilbert M.R. Clinical discussion of the management of anaplastic oligodendroglioma/oligoastrocytoma (both codeleted and noncodeleted). *J Natl Compr Canc Netw* 2014;12(5):665–72. DOI: 10.6004/jnccn.2014.0070
- Jiao Y., Killela P.J., Reitman Z.J. et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 2012;3(7):709–22. DOI: 10.18632/oncotarget.588

21. Karsy M., Guan J., Cohen A.L. et al. New molecular considerations for glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017;17(2):19. DOI: 10.1007/s11910-017-0722-5
22. England B., Huang T., Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol* 2013;34(4):2063–74. DOI: 10.1007/s13277-013-0871-3
23. Kamran N., Alghamri M.S., Nunez F.J. et al. Current state and future prospects of immunotherapy for glioma. *Immunotherapy* 2018;10(4):317–39. DOI: 10.2217/imt-2017-0122
24. Marumoto T., Saya H. Molecular biology of glioma. *Adv Exp Med Biol* 2012;746:2–11. DOI: 10.1007/978-1-4614-3146-6_1
25. Network T.C. Corrigendum: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2013;494(7438):506. DOI: 10.1038/nature11903
26. Galbraith K., Snuderl M. Molecular pathology of gliomas. *Surg pathol clin* 2021;14(3):379–86. DOI: 10.1016/j.path.2021.05.003
27. Halperin E.C., Brady L.W., Wazer D.E. et al. *Perez & Brady's principles and practice of radiation oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
28. Ostrom Q.T., Patil N., Cioffi G. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol* 2020;22(12 Suppl. 2): iv1–96. DOI: 10.1093/neuonc/noaa200
29. Maire C.L., Ligon K.L. Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro Oncol* 2014; 16(Suppl. 8):viii1–6. DOI: 10.1093/neuonc/nou294
30. Westphal M., Maire C.L., Lamszus K. EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise. *CNS Drugs* 2017;31(9):723–35. DOI: 10.1007/s40263-017-0456-6
31. Yamazaki H., Ohba Y., Tamaoki N. et al. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 1990;81(8):773–9. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1990.tb02644.x
32. Pearson J.R.D., Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduct Target Ther* 2017;2:17040. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.40
33. Orellana L., Thorne A.H., Lema R. et al. Oncogenic mutations at the EGFR ectodomain structurally converge to remove a steric hindrance on a kinase-coupled cryptic epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116(20):10009–18. DOI: 10.1073/pnas.1821442116
34. Binder Z.A., Thorne A.H., Bakas S. et al. Epidermal growth factor receptor extracellular domain mutations in glioblastoma present opportunities for clinical imaging and therapeutic development. *Cancer Cell* 2018;34(1):163–77.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.06.006
35. Raizer J.J., Giglio P., Hu J. et al. A phase II study of bevacizumab and erlotinib after radiation and temozolomide in MGMT unmethylated GBM patients. *J Neurooncol* 2016;126(1):185–92. DOI: 10.1007/s11060-015-1958-z
36. Peereboom D.M., Ahluwalia M.S., Ye X. et al. NABTT 0502: a phase II and pharmacokinetic study of erlotinib and sorafenib for patients with progressive or recurrent glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2013;15(4):490–6. DOI: 10.1093/neuonc/nos322
37. Sathornsumetee S., Desjardins A., Vredenburgh J.J. et al. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol* 2010;12(12):1300–10. DOI: 10.1093/neuonc/noq099
38. Hegi M.E., Diserens A.C., Bady P. et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib – a phase II trial. *Mol Cancer Ther* 2011;10(6):1102–12. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0048
39. Lassman A.B., Pugh S.L., Wang T.J.C. et al. Depatuzumab mafodotin in EGFR-amplified newly diagnosed glioblastoma: a phase III randomized clinical trial. *Neuro Oncol* 2023;25(2):339–50. DOI: 10.1093/neuonc/noac173
40. Hasselbalch B., Lassen U., Hansen S. et al. Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro Oncol* 2010;12(5):508–16. DOI: 10.1093/neuonc/nop063
41. McCrea H.J., Ivanidze J., O'Connor A. et al. Intraarterial delivery of bevacizumab and cetuximab utilizing blood-brain barrier disruption in children with high-grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma: results of a phase I trial. *J Neurosurg Pediatr* 2021;28(4):371–9. DOI: 10.3171/2021.3.PEDS20738
42. Westphal M., Heese O., Steinbach J.P. et al. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer* 2015;51(4):522–32. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.12.019
43. Solomón M.T., Selva J.C., Figueredo J. et al. Radiotherapy plus nimotuzumab or placebo in the treatment of high grade glioma patients: results from a randomized, double blind trial. *BMC Cancer* 2013;13:299. DOI: 10.1186/1471-2407-13-299
44. Bagley S.J., Desai A.S., Linette G.P. et al. CAR T-cell therapy for glioblastoma: recent clinical advances and future challenges. *Neuro Oncol* 2018;20(11):1429–38. DOI: 10.1093/neuonc/noy032
45. Lv S., Teugels E., Sadones J. et al. Correlation of EGFR, IDH1 and PTEN status with the outcome of patients with recurrent glioblastoma treated in a phase II clinical trial with the EGFR-blocking monoclonal antibody cetuximab. *Int J Oncol* 2012;41(3):1029–35. DOI: 10.3892/ijo.2012.1539
46. Daneshimehr F., Barabadi Z., Abdolahi S. et al. Angiogenesis and its targeting in glioblastoma with focus on clinical approaches. *Cell J* 2022;24(10):555–68. DOI: 10.22074/cellj.2022.8154
47. Westermark B. Platelet-derived growth factor in glioblastoma-driver or biomarker? *Ups J Med Sci* 2014;119(4):298–305. DOI: 10.3109/03009734.2014.970304
48. Lane R., Cilibrasi C., Chen J. et al. PDGF-R inhibition induces glioblastoma cell differentiation via DUSP1/p38MAPK signalling. *Oncogene* 2022;41(19):2749–63. DOI: 10.1038/s41388-022-02294-x
49. Boichuk S., Dunaev P., Galembikova A. et al. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) activates vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in gastrointestinal stromal tumors (GIST): an autocrine mechanism contributing to imatinib mesylate (IM) resistance. *Cancers (Basel)* 2024;16(17):3103. DOI: 10.3390/cancers16173103
50. Boichuk S., Dunaev P., Skripova V. Unraveling the mechanisms of sensitivity to anti-FGF therapies in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) lacking secondary KIT mutations. *Cancers (Basel)* 2023;15(22):5354. DOI: 10.3390/cancers15225354
51. Boichuk S., Galembikova A., Mikheeva E. et al. Inhibition of FGF2-mediated signaling in GIST-promising approach for overcoming resistance to imatinib. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1674. DOI: 10.3390/cancers12061674
52. Boichuk S., Dunaev P., Galembikova A. et al. Inhibition of FGFR2-signaling attenuates a homology-mediated DNA repair in GIST and sensitizes them to DNA-topoisomerase II inhibitors. *Int J Mol Sci* 2020;21(1):352. DOI: 10.3390/ijms21010352
53. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. Targeting of FGF-signaling re-sensitizes gastrointestinal stromal tumors (GIST) to imatinib *in vitro* and *in vivo*. *Molecules* 2018;23(10):2643. DOI: 10.3390/molecules23102643
54. Morrison R.S., Yamaguchi F., Saya H. et al. Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *J Neurooncol* 1994;18(3):207–16. DOI: 10.1007/BF01328955
55. Loilome W., Joshi A.D., ap Rhys C.M. et al. Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of fibroblast growth factor pathway signaling. *J Neurooncol* 2009;94(3):359–66. DOI: 10.1007/s11060-009-9885-5
56. Yamaguchi F., Saya H., Bruner J.M., Morrison R.S. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes

- is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(2):484–8. DOI: 10.1073/pnas.91.2.484
57. Jimenez-Pascual A., Hale J.S., Kordowski A. et al. ADAMDEC1 maintains a growth factor signaling loop in cancer stem cells. *Cancer Discov* 2019;9(11):1574–89. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1308
 58. Singh D., Chan J.M., Zoppioli P. et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science* 2012;337(6099):1231–5. DOI: 10.1126/science.1220834
 59. Jimenez-Pascual A., Siebzehnrbul F.A. Fibroblast growth factor receptor functions in glioblastoma. *Cells* 2019;8(7):715. DOI: 10.3390/cells8070715
 60. Kowalski-Chauvel A., Gouaze-Andersson V., Baricault L. et al. Alpha6-integrin regulates FGFR1 expression through the ZEB1/YAP1 transcription complex in glioblastoma stem cells resulting in enhanced proliferation and stemness. *Cancers (Basel)* 2019;11(3):406. DOI: 10.3390/cancers11030406
 61. Gouaze-Andersson V., Delmas C., Taurand M. et al. FGFR1 induces glioblastoma radioresistance through the PLC γ /Hif1 α pathway. *Cancer Res* 2016;76(10):3036–44. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2058
 62. Brown N.F., Ng S.M., Brooks C. A phase II open label, randomised study of ipilimumab with temozolomide versus temozolomide alone after surgery and chemoradiotherapy in patients with recently diagnosed glioblastoma: the Ipi-Glio trial protocol. *BMC Cancer* 2020;20(1):198. DOI: 10.1186/s12885-020-6624-y
 63. Carter T., Shaw H., Cohn-Brown D. et al. Ipilimumab and bevacizumab in glioblastoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2016;28(10):622–6. DOI: 10.1016/j.clon.2016.04.042
 64. Ellsworth S.G., Grossman S.A. Immunotherapeutic strategies for the treatment of glioma. NY: Academic Press, 2022. Pp. 1–17.
 65. Singh S., Barik D., Lawrie K. et al. Unveiling novel avenues in mTOR-targeted therapeutics: advancements in glioblastoma treatment. *Int J Mol Sci* 2023;24(19):14960. DOI: 10.3390/ijms241914960
 66. Hashemi M., Etemad S., Rezaei S. et al. Progress in targeting PTEN/PI3K/Akt axis in glioblastoma therapy: revisiting molecular interactions. *Biomed Pharmacother* 2023;158:114204. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114204
 67. De Los Reyes Corrales T., Losada-Pérez M., Casas-Tintó S. JNK pathway in CNS pathologies. *Int J Mol Sci* 2021;22(8):3883. DOI: 10.3390/ijms22083883
 68. Cirotti C., Contadini C., Barilà D. SRC Kinase in glioblastoma news from an old acquaintance. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1558. DOI: 10.3390/cancers12061558
 69. Ou A., Ott M., Fang D., Heimberger A.B. The role and therapeutic targeting of JAK/STAT signaling in glioblastoma. *Cancers (Basel)* 2021;13(3):437. DOI: 10.3390/cancers13030437
 70. Wu W., Klockow J.L., Zhang M. et al. Glioblastoma multiforme (GBM): an overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res* 2021;171:105780. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105780
 71. Sanmamed M.F., Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J* 2014;20(4):256–61. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000061
 72. Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., Freeman G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;8(3):239–45. DOI: 10.1038/ni1443
 73. Pesce S., Greppi M., Tabellini G. et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: a phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139(1):335–46.e3. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.04.025
 74. Pardoll D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64. DOI: 10.1038/nrc3239
 75. Ohaegbulam K.C., Assal A., Lazar-Molnar E. et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med* 2015;21(1):24–33. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.10.009
 76. Dong P., Xiong Y., Yue J. et al. Tumor-intrinsic PD-L1 signaling in cancer initiation, development and treatment: beyond immune evasion. *Front Oncol* 2018;8:386. DOI: 10.3389/fonc.2018.00386
 77. Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 2020;10(3):727–42.
 78. Qian J., Wang C., Wang B. et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. *J Neuroinflammation* 2018;15(1):290. DOI: 10.1186/s12974-018-1330-2
 79. Parsa A.T., Waldron J.S., Panner A. et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13(1):84–8. DOI: 10.1038/nm1517
 80. Heiland D.H., Haaker G., Delev D. et al. Comprehensive analysis of PD-L1 expression in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 2017;8(26):42214–25. DOI: 10.18632/oncotarget.15031
 81. Peng H., Li Z., Fu J., Zhou R. Growth and differentiation factor 15 regulates PD-L1 expression in glioblastoma. *Cancer Manag Res* 2019;11:2653–61. DOI: 10.2147/CMAR.S192095
 82. Shu C., Li Q. Current advances in PD-1/PD-L1 axis-related tumour-infiltrating immune cells and therapeutic regimens in glioblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020;151:102965. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102965
 83. Kline C., Liu S.J., Duriseti S. et al. Reirradiation and PD-1 inhibition with nivolumab for the treatment of recurrent diffuse intrinsic pontine glioma: a single-institution experience. *J Neurooncol* 2018;140(3):629–38. DOI: 10.1007/s11060-018-2991-5
 84. Reardon D.A., Omuro A., Brandes A.A. et al. OS10.3 Randomized phase 3 study evaluating the efficacy and safety of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: CheckMate 143. *Neuro Oncol* 2017;19(Suppl. 3):iii21. DOI: 10.1093/neuonc/nox036.071
 85. Reardon D.A., Brandes A.A., Omuro A. et al. Effect of nivolumab vs bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma: the CheckMate 143 phase 3 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020;6(7):1003–10. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.1024
 86. Lowther D.E., Weinhold K., Reap E. et al. CBM-06: immune biomarker results from a trial of nivolumab \pm ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: CheckMate-143. *Neuro Oncol* 2015;17(Suppl. 5):v70. DOI: 10.1093/neuonc/nov211.06
 87. Omuro A., Vlahovic G., Baehring J. et al. OS07.3 nivolumab in combination with radiotherapy with or without temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma: updated results from CheckMate 143. *Neuro Oncol* 2017;19(Suppl. 3):iii13. DOI: 10.1093/neuonc/nox036.044
 88. Omuro A. Immune-checkpoint inhibitors for glioblastoma: what have we learned? *Arq Neuropsiquiatr* 2022;80(5 Suppl. 1): 266–9. DOI: 10.1590/0004-282X-ANP-2022-S129
 89. Cloughesy T.F., Mochizuki A.Y., Orpilla J.R. et al. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat Med* 2019;25(3):477–86. DOI: 10.1038/s41591-018-0337-7
 90. Lombardi G., Barresi V., Indraccolo S. et al. Pembrolizumab activity in recurrent high-grade gliomas with partial or complete loss of mismatch repair protein expression: a monocentric, observational and prospective pilot study. *Cancers (Basel)* 2020;12(8):2283. DOI: 10.3390/cancers12082283
 91. Nayak L., Molinaro A.M., Peters K. et al. Randomized phase II and biomarker study of pembrolizumab plus bevacizumab versus pembrolizumab alone for patients with recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2021;27(4):1048–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2500
 92. Zhao J., Chen A.X., Gartrell R.D. et al. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nat Med* 2019;25(3):462–9. DOI: 10.1038/s41591-019-0349-y

93. Nayak L., Standifer N., Dietrich J. et al. Circulating immune cell and outcome analysis from the phase II study of PD-L1 blockade with durvalumab for newly diagnosed and recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2022;28(12):2567–78. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-4064
94. Jacques F.H., Nicholas G., Lorimer I.A.J. et al. Avelumab in newly diagnosed glioblastoma. *Neurooncol Adv* 2021;3(1):vdb118. DOI: 10.1093/oaajnl/vdab118
95. Awada G., Ben Salama L., De Cremer J. et al. Axitinib plus avelumab in the treatment of recurrent glioblastoma: a stratified, open-label, single-center phase 2 clinical trial (GliAvAx). *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e001146. DOI: 10.1136/jitc-2020-001146
96. Xu S., Tang L., Li X. et al. Immunotherapy for glioma: current management and future application. *Cancer Lett* 2020;476:1–12. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.002
97. Buchbinder E.I., Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol* 2016;39(1):98–106. DOI: 10.1097/COC.0000000000000239
98. Fife B.T., Bluestone J.A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008;224:166–82. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x
99. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192(2):303–10. DOI: 10.1084/jem.192.2.303
100. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008;322(5899):271–5. DOI: 10.1126/science.1160062
101. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677–704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
102. Guo Q., Shen S., Guan G. et al. Cancer cell intrinsic TIM-3 induces glioblastoma progression. *iScience* 2022;25(11):105329. DOI: 10.1016/j.isci.2022.105329
103. Harris-Bookman S., Mathios D., Martin A.M. et al. Expression of LAG-3 and efficacy of combination treatment with anti-LAG-3 and anti-PD-1 monoclonal antibodies in glioblastoma. *Int J Cancer* 2018;143(12):3201–8. DOI: 10.1002/ijc.31661
104. Yeo J., Ko M., Lee D.H. et al. TIGIT/CD226 axis regulates anti-tumor immunity. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14(3):200. DOI: 10.3390/ph14030200
105. Lucca L.E., Lerner B.A., Park C. et al. Differential expression of the T-cell inhibitor TIGIT in glioblastoma and MS. *Neuro Immunol Neuroinflamm* 2020;7(3):e712. DOI: 10.1212/NXI.0000000000000712
106. Dixon K.O., Schorer M., Nevin J. et al. Functional Anti-TIGIT antibodies regulate development of autoimmunity and antitumor immunity. *J Immunol* 2018;200(8):3000–7. DOI: 10.4049/jimmunol.1700407
107. Hung A.L., Maxwell R., Theodoros D. et al. TIGIT and PD-1 dual checkpoint blockade enhances antitumor immunity and survival in GBM. *Oncoimmunology* 2018;7(8):e1466769. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1466769
108. Wei S.C., Levine J.H., Cogdill A.P. et al. Distinct cellular mechanisms underlie anti-CTLA-4 and anti-PD-1 checkpoint blockade. *Cell* 2017;170(6):1120–33.e17. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.024
109. Borish L.C., Steinke J.W. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2 Suppl):S460–75. DOI: 10.1067/mai.2003.108
110. Silk A.W., Margolin K. Cytokine Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2019;33(2):261–74. DOI: 10.1016/j.hoc.2018.12.004
111. Yamanaka R. Glioma: immunotherapeutic approached. NY: Springer Science + Business Media, 2012.
112. Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013;38(1):13–25. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.01.004
113. Malek T.R., Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010;33(2):153–65. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.004
114. Liao W., Lin J.X., Wang L. et al. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* 2011;12(6):551–9. DOI: 10.1038/ni.2030
115. Colombo F., Barzon L., Franchin E. et al. Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results. *Cancer Gene Ther* 2005;12(10):835–48. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700851
116. Okada H., Lieberman F.S., Walter K.A. et al. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J Transl Med* 2007;5:67. DOI: 10.1186/1479-5876-5-67
117. Weber F., Asher A., Buchholz R. et al. Safety, tolerability, and tumor response of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2003;64(1–2):125–37. DOI: 10.1007/BF02700027
118. Mut M., Sherman J.H., Shaffrey M.E., Schiff D. Cintredekin besudotox in treatment of malignant glioma. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(6):805–12. DOI: 10.1517/14712598.8.6.805
119. Kunwar S., Prados M.D., Chang S.M. et al. Direct intracerebral delivery of cintredekin besudotox (IL13-PE38QQR) in recurrent malignant glioma: a report by the Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group. *J Clin Oncol* 2007;25(7):837–44. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.1117
120. Vogelbaum M.A., Sampson J.H., Kunwar S. et al. Convection-enhanced delivery of cintredekin besudotox (interleukin-13-PE38QQR) followed by radiation therapy with and without temozolomide in newly diagnosed malignant gliomas: phase I study of final safety results. *Neurosurgery* 2007;61(5):1031–7; discussion 1037–8. DOI: 10.1227/01.neu.0000303199.77370.9e
121. Kunwar S., Chang S., Westphal M. et al. Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010;12(8):871–81. DOI: 10.1093/neuonc/nop054
122. Pestka S., Krause C.D., Walter M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8–32. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x
123. Bandurska K., Król I., Myga-Nowak M. Interferony: między strukturą a funkcją [Interferons: between structure and function]. *Postepy Hig Med Dosw* 2014;68:428–40. DOI: 10.5604/17322693.1101229
124. Исмаилова А.А., Розумбетов Р.Ж., Петрова Т.А. и др. Эффект интерферонов I типа: от молекул до организма. *Журнал теоретической и клинической медицины* 2018;3:25–31. Ismailova A.A., Rozumbetov R.J., Petrova T.A. et al. The effect of type I interferons: from molecules to the body. *Zhurnal teoreticheskoy i klinicheskoy meditsiny = Journal of Theoretical and Clinical Medicine* 2018;3:25–31. (In Russ.).
125. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):163–89. DOI: 10.1189/jlb.0603252
126. Groves M.D., Puduvalli V.K., Gilbert M.R. et al. Two phase II trials of temozolomide with interferon-alpha2b (pegylated and non-pegylated) in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer* 2009;101(4):615–20. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605189
127. Wākabayashi T., Kayama T., Nishikawa R. et al. A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon-β and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report. *J Neurooncol* 2011;104(2):573–7. DOI: 10.1007/s11060-011-0529-1
128. Kjellman C., Olofsson S.P., Hansson O. et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* 2000;89(3):251–8. DOI: 10.1002/1097-0215(20000520)89:3<251::aid-ijc7>3.0.co;2-5
129. Schlingensiepen K.H., Schlingensiepen R., Steinbrecher A. et al. Targeted tumor therapy with the TGF-beta 2 antisense compound

- AP 12009. Cytokine Growth Factor Rev 2006;17(1–2):129–39. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.002
130. Bogdahn U., Hau P., Stockhammer G. et al. Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF- β 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol* 2011;13(1):132–42. DOI: 10.1093/neuonc/noq142
 131. Okamoto Y., Shimizu K., Tamura K. et al. An adoptive immunotherapy of patients with medulloblastoma by lymphokine-activated killer cells (LAK). *Acta Neurochir (Wien)* 1988;94(1–2): 47–52. DOI: 10.1007/BF01406615
 132. Sankhla S.K., Nadkarni J.S., Bhagwati S.N. Adoptive immunotherapy using lymphokine-activated killer (LAK) cells and interleukin-2 for recurrent malignant primary brain tumors. *J Neurooncol* 1996;27(2):133–40. DOI: 10.1007/BF00177476
 133. Yoshida S., Tanaka R., Takai N., Ono K. Local administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 to patients with malignant brain tumors. *Cancer Res* 1988;48(17):5011–6.
 134. Swartz A.M., Batich K.A., Fecci P.E., Sampson J.H. Peptide vaccines for the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol* 2015;123(3):433–40. DOI: 10.1007/s11060-014-1676-y
 135. Sturm D., Bender S., Jones D.T. et al. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer* 2014;14(2):92–107. DOI: 10.1038/nrc3655
 136. Elsamadicy A.A., Chongsathidkiet P., Desai R. et al. Prospect of rindopepimut in the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17(4):507–13. DOI: 10.1080/14712598.2017.1299705
 137. Sampson J.H., Heimberger A.B., Archer G.E. et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010;28(31):4722–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.6963
 138. Sampson J.H., Aldape K.D., Archer G.E. et al. Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol* 2011;13(3):324–33. DOI: 10.1093/neuonc/noq157
 139. Weller M., Butowski N., Tran D.D. et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(10):1373–85. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X
 140. Rampling R., Peoples S., Mulholland P.J. et al. A cancer research UK First time in human phase I trial of IMA950 (novel multipeptide therapeutic vaccine) in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2016;22(19):4776–85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0506
 141. Johanns T.M., Garfinkle E.A.R., Miller K.E. et al. Integrating multisector molecular characterization into personalized peptide vaccine design for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2024;30(13):2729–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-23-3077
 142. Schaller T.H., Sampson J.H. Advances and challenges: dendritic cell vaccination strategies for glioblastoma. *Expert Rev Vaccines* 2017;16(1):27–36. DOI: 10.1080/14760584.2016.1218762
 143. Ardon H., Van Gool S., Lopes I.S. et al. Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the primary treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a pilot study. *J Neurooncol* 2010;99(2):261–72. DOI: 10.1007/s11060-010-0131-y
 144. Балдуева И.А., Новик А.В., Ефремова Н.А. и др. Эффективность лечения первичных опухолей центральной нервной системы аутологичной дендритно-клеточной вакциной CaTeVac. *Вопросы онкологии* 2022;приложение 3:157. Baldueva I.A. Novik A.V., Efremova N.A. et al. Efficiency of treatment of primary tumors of the central nervous system with autologous dendritic cell vaccine CaTeVac. *Voprosy Onkologii = Oncology Issues* 2022;Appendix 3:157 (In Russ.).
 145. Kikuchi T., Akasaki Y., Abe T. et al. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother* 2004;27(6):452–9. DOI: 10.1097/00002371-200411000-00005
 146. Yu J.S., Liu G., Ying H. et al. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2004;64(14):4973–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3505
 147. Кулева С.А., Борокшинова К.М., Балдуева И.А. и др. Опыт использования мультитаргетной противоопухолевой вакцины у ребенка с диффузной срединной глиомой головного мозга с альтерацией в гене H3 K27. *Вопросы онкологии* 2023;69(3):555–64. DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-555-564 S.A. Kulyova S.A., Borokshinova K.M., Baldueva I.A. et al. Experience of using a multitargeted antitumor vaccine in a child with diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2023;69(3):555–64. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-3-555-564
 148. Ridolfi L., Gurrieri L., Riva N. et al. First step results from a phase II study of a dendritic cell vaccine in glioblastoma patients (CombiG-vax). *Front Immunol* 2024;15:1404861. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1404861
 149. Yu J.X., Upadhaya S., Tataka R. et al. Cancer cell therapies: the clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov* 2020;19(9):583–4. DOI: 10.1038/d41573-020-00099-9
 150. Lin H., Cheng J., Mu W. et al. Advances in universal CAR-T cell therapy. *Front Immunol* 2021;12:744823. DOI: 10.3389/fimmu.2021.744823
 151. Labanieh L., Majzner R.G., Mackall C.L. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng* 2018;2(6):377–91. DOI: 10.1038/s41551-018-0235-9
 152. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 2010;116(20):4099–102. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281931
 153. Qazi M.A., Vora P., Venugopal C. et al. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann Oncol* 2017;28(7):1448–56. DOI: 10.1093/annonc/mdx169
 154. Hao C., Parney I.F., Roa W.H. et al. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. *Acta Neuropathol* 2002;103(2):171–8. DOI: 10.1007/s004010100448
 155. Mirzaei R., Sarkar S., Yong V.W. T cell exhaustion in glioblastoma: intricacies of immune checkpoints. *Trends Immunol* 2017;38(2):104–15. PMID: 27964820. DOI: 10.1016/j.it.2016.11.005
 156. Zhu C., Mustafa D., Zheng P.P. et al. Activation of CECR1 in M2-like TAMs promotes paracrine stimulation-mediated glial tumor progression. *Neuro Oncol* 2017;19(5):648–59. DOI: 10.1093/neuonc/now251
 157. Li L., Zhu X., Qian Y. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in glioblastoma: current and future. *Front Immunol* 2020;11:594271. DOI: 10.3389/fimmu.2020.594271
 158. Karschnia P., Teske N., Thon N. et al. Chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma: current concepts, challenges, and future perspectives. *Neurology* 2021;97(5):218–30. DOI: 10.1212/WNL.00000000000012193
 159. Brown C.E., Alizadeh D., Starr R. et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N Engl J Med* 2016;375(26):2561–9. DOI: 10.1056/NEJMoa1610497
 160. Ahmed N., Brawley V., Hegde M. et al. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T cells for progressive glioblastoma: a phase I dose-escalation trial. *JAMA Oncol* 2017;3(8):1094–101. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.0184
 161. O'Rourke D.M., Nasrallah M.P., Desai A. et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients

- with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2017;9(399):eaaa0984. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa0984
162. Maggs L., Cattaneo G., Dal A.E. et al. CAR T cell-based immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Front Neurosci* 2021;15:662064. DOI: 10.3389/fnins.2021.662064
163. Keu K.V., Witney T.H., Yaghoubi S. et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci Transl Med* 2017;9(373):eaag2196. DOI: 10.1126/scitranslmed.aag2196
164. Bielamowicz K., Fousek K., Byrd T.T. et al. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2018;20(4):506–18. DOI: 10.1093/neuonc/nox182
165. Krenciute G., Prinzing B.L., Yi Z. et al. Transgenic expression of IL15 improves antiglioma activity of IL13R α 2-CAR T cells but results in antigen loss variants. *Cancer Immunol Res* 2017;5(7):571–81. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0376
166. Lamfers M.L., Grill J., Dirven C.M. et al. Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy. *Cancer Res* 2002;62(20):5736–42.
167. Lang F.F., Conrad C., Gomez-Manzano C. et al. Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2018;36(14):1419–27. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.8219
168. Chiocca E.A., Abbed K.M., Tatter S. et al. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. *Mol Ther* 2004;10(5):958–66. DOI: 10.1016/j.ymthe.2004.07.021
169. Alessandrini F., Menotti L., Avitabile E. et al. Eradication of glioblastoma by immuno-virotherapy with a retargeted oncolytic HSV in a preclinical model. *Oncogene* 2019;38(23):4467–79. DOI: 10.1038/s41388-019-0737-2
170. Markert J.M., Razdan S.N., Kuo H.C. et al. A phase I trial of oncolytic HSV-1, G207, given in combination with radiation for recurrent GBM demonstrates safety and radiographic responses. *Mol Ther* 2014;22(5):1048–55. DOI: 10.1038/mt.2014.22
171. Desjardins A., Gromeier M., Herndon J.E. et al. Recurrent glioblastoma treated with recombinant poliovirus. *N Engl J Med* 2018;379(2):150–61. DOI: 10.1056/NEJMoa1716435

Вклад авторов

А.А. Пичугин, Р.Р. Ковязина: сбор и обработка данных, написание текста статьи;
 А.А. Трондин: сбор и обработка данных, подготовка иллюстраций;
 А.Г. Алексеев, П.Б. Копнин, Т.В. Гессель: обработка данных, научное редактирование;
 С.В. Бойчук: сбор и обработка данных, написание текста статьи, научное редактирование.

Authors' contributions

A.A. Pichugin, R.R. Koviagina: data collection and processing, article writing;
 A.A. Trondin: data collection and processing, preparation of illustrations;
 A.G. Alekseev, P.B. Kopnin, T.V. Gessel: data processing, scientific editing;
 S.V. Boichuk: data collection and processing, article writing, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Пичугин / A.A. Pichugin: <https://orcid.org/0000-0002-0134-1005>
 Р.Р. Ковязина / R.R. Koviagina: <https://orcid.org/0000-0002-6165-3668>
 А.А. Трондин / A.A. Trondin: <https://orcid.org/0000-0002-8046-2533>
 А.Г. Алексеев / A.G. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-1227-8918>
 П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>
 Т.В. Гессель / T.V. Gessel: <https://orcid.org/0009-0003-4348-9141>
 С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: <https://orcid.org/0000-0003-2415-1084>

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 25-25-00391).
Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 25-25-00391).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-41-53>

Роль нарушения цикла метионина в инициации и прогрессии злокачественных опухолей

Т.Г. Рукша¹, М.Н. Курбат², Н.В. Палкина¹, В.А. Куценко¹

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

²УО «Гродненский государственный медицинский университет»; Республика Беларусь, 230009 Гродно, ул. Горького, 80

Контакты: Татьяна Геннадьевна Рукша tatyana_ruksha@mail.ru

Метиониновый цикл отвечает за обмен веществ, связанных с метионином – одним из незаменимых аминокислотных компонентов белков. При нарушении регуляции этого процесса происходит накопление непротеиногенной аминокислоты гомоцистеина, что может негативно влиять на организм человека. Существует множество исследований, посвященных изучению воздействия данных нарушений на развитие болезней системы кровообращения, однако их роль в развитии злокачественных новообразований остается малоизученной. Цель обзора – проанализировать научные работы, в которых рассматривается влияние сбоя регуляции метионинового катаболизма на возникновение и прогрессирование опухолевого роста. Понимание метаболических изменений, связанных с канцерогенезом, имеет большое значение для разработки новых классов терапевтических препаратов, а также стратегий комбинированного противоопухолевого лечения, в том числе направленных на преодоление метаболических особенностей опухолевых клеток.

Ключевые слова: метионин, гомоцистеин, канцерогенез, опухолевая прогрессия, химиотерапия

Для цитирования: Рукша Т.Г., Курбат М.Н., Палкина Н.В., Куценко В.А. Роль нарушения цикла метионина в инициации и прогрессии злокачественных опухолей. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):41–53.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-41-53>

The role of methionine cycle disruption in the initiation and progression of malignant tumors

T.G. Ruksha¹, M.N. Kurbat², N.V. Palkina¹, V.A. Kutsenko¹

¹Prof. V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

²Grodno State Medical University; 80 Gorkogo St., Grodno 230009, Republic of Belarus

Contacts: Tatiana Gennadievna Ruksha tatyana_ruksha@mail.ru

The methionine cycle is responsible for the metabolism of substances associated with methionine, one of the essential amino acids for protein synthesis. The methionine cycle dysregulation leads to non-proteinogenic amino acid homocysteine accumulation that can have a negative impact on a health. Numerous studies describe homocysteine effect on cardiovascular pathology development but its role in carcinogenesis remains poorly understood. Therefore, the purpose of this review is to analyze scientific data regarding the role of methionine catabolism dysregulation in a cell neoplastic transformation and tumor growth. Understanding cellular alterations of methionine metabolism is important for novel anti-cancer drugs development as well as establishing approaches for combinatorial treatment strategies aiming to overcome metabolic plasticity of cancer cells and their drug resistance.

Keywords: methionine, homocysteine, carcinogenesis, tumor progression, chemotherapy

For citation: Ruksha T.G., Kurbat M.N., Palkina N.V., Kutsenko V.A. The role of methionine cycle disruption in the initiation and progression of malignant tumors. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(4):41–53. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-41-53>

ВВЕДЕНИЕ

Детализированное понимание процессов метаболизма нормальных и опухолевых клеток предоставляет огромные возможности для разработки новых классов лекарственных средств, нацеленных на ключевые характеристики клеток опухоли. Формирование представлений о молекулярных механизмах внутриклеточных процессов позволяет открыть новые горизонты в борьбе с онкологическими заболеваниями и дает шанс создать уникальные терапевтические препараты. Множество исследований подтверждают факт метаболического атипизма опухолевых клеток. Одним из метаболических процессов, который происходит как в нормальных, так и в злокачественных клетках, является цикл метионина.

Метионин – незаменимая аминокислота, которая поступает в организм с пищей и может быть получена из продуктов животного происхождения, таких как мясо, рыба, яйца и молочные продукты, а также из некоторых растительных продуктов, например из бобовых и орехов [1]. Организм использует метионин для синтеза белков и других биологически активных веществ, в частности, креатина и карнитина. Кроме того, метионин участвует в метаболизме холина и фосфатидилхолина [2]. Гомоцистеин – непротеиногенная аминокислота, которая, в свою очередь, образуется в результате метаболизма метионина в метиониновом цикле. Обмен метионина и связанные с ним метаболические процессы представлены на рис. 1. Метионин, являющийся незаменимой аминокислотой, занимает

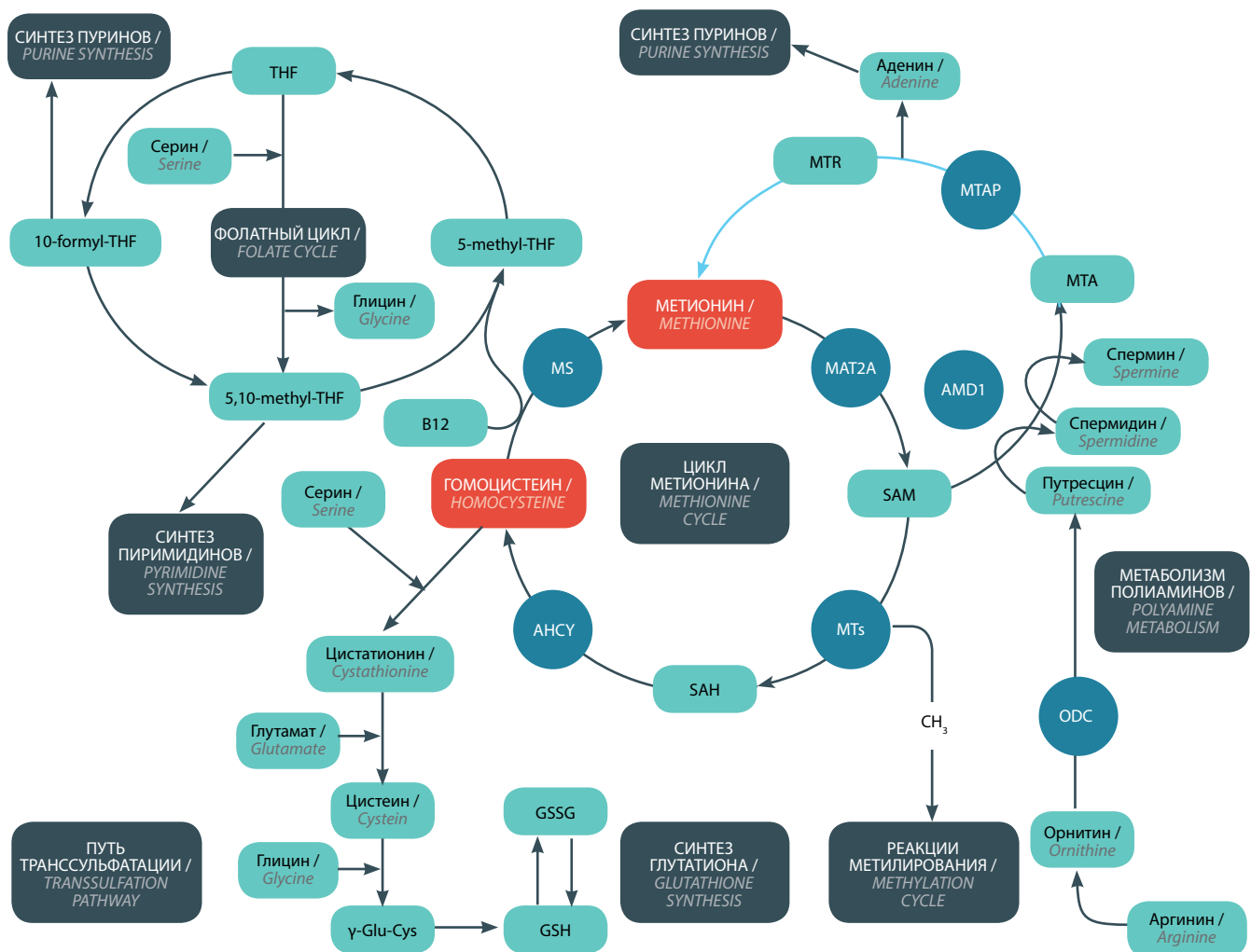


Рис. 1. Метаболизм метионина и связанные с ним метаболические процессы (адаптировано из [3]). MAT2A – метионинаденозилтрансфераза; SAM – S-аденозилметионин; SAH – S-аденозилгомоцистеин; ANCY – аденозилгомоцистеиназа; MS – метионинсинтаза; MTA – метилтиоаденозин; ODC – орнитиндекарбоксилаза; AMD1 – аденозилметиониндекарбоксилаза; B12 – витамин B12; γ -Glu-Cys – γ -глутамил-л-цистеин; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; MTA – метилтиоаденозинфосфориллаза; MTR – метилтиорибоза; THF – тетрагидрофолат

Fig. 1. Metabolism of methionine and associated metabolic processes (adapted from [3]). MAT2A – methionine adenosyltransferase; SAM – S-adenosylmethionine; SAH – S-adenosylhomocysteine, ANCY – adenosylhomocysteine; MS – methionine synthase; MTA – methylthioadenosine; ODC – ornithine decarboxylase; AMD1 – adenosylmethionine decarboxylase; B12 – vitamin B12; γ -Glu-Cys – γ -glutamyl-l-cysteine; GSH – reduced glutathione; GSSG – oxidized glutathione; MTA – methylthioadenosine phosphorylase; MTR – methylthioribose; THF – tetrahydrofolate

важное место в одноуглеродной метаболической сети, способствует реализации множества метаболических процессов, включая синтез полиаминов и нуклеотидов (пуринов и пиримидинов), а также генерацию глутатиона. Метионин катаболизируется ферментом метионинаденозилтрансферазой (MAT2A, EC 2.5.1.6), образуя универсальный донор метила под названием S-аденозилметионин (SAM). Метилтрансферазы используют SAM в качестве источника метильных групп, образуя S-аденозилгомоцистеин (SAH), который действует как негативный регулятор процессов, зависящих от SAM. SAH затем превращается в гомоцистеин при участии фермента аденозилгомоцистеиназы (AHCSY, EC 3.13.2.1).

Гомоцистеин далее может участвовать в пути транссульфурации, который заканчивается превращением гомоцистеина в цистеин. Этот процесс происходит в печени и кишечнике. Для успешного превращения гомоцистеина в цистеин необходим витамин B6 [4]. Также во всех клетках организма гомоцистеин способен обратно превращаться в метионин с помощью фермента метионинсинтазы (MS, EC 2.1.1.13), завершая тем самым цикл метионина. Для успешного реметилирования гомоцистеина необходимы фолиевая кислота, витамин B12 и витамин B6. Они играют большую роль в превращении и преобразовании гомоцистеина, обеспечивая его стабильность и необходимые реакции [5]. Однако в клетках печени и почек гомоцистеин может быть альтернативно реметилирован с использованием бетаина, который образуется из холина при участии фермента бетаингомоцистеин-S-метилтрансферазы (BHMT, EC 2.1.1.5), экспрессирующейся преимущественно в ткани указанных органов, и это биохимическое преобразование не зависит от присутствия фолатов [6].

Помимо реметилирования гомоцистеина, метионин может быть образован из побочного продукта биосинтеза полиаминов — метилтиоаденозина (MTA) — при утилизации метионина в так называемом биохимическом пути восстановления метионина. Кроме перечисленных функций метионин также является источником SAM для биосинтеза полиаминов. Полиамин путресцин образуется из орнитина (производного аргинина) при участии фермента орнитиндекарбоксилазы (ODC, EC 4.1.1.17). Затем с помощью спермидинсинтазы путресцин может превратиться в спермидин. Этот процесс также требует наличия декарбоксилированного SAM, который служит донором аминопропильной группы, а его образование, в свою очередь, катализирует фермент аденозилметиониндекарбоксилаза 1 (AMD1, EC 4.1.1.50). Далее спермидин может быть превращен в конечный полиамин спермин в процессе, также зависимом от SAM [7].

НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ МЕТИОНИНОВОГО ЦИКЛА

Из-за нарушения процессов метилирования или транссульфурации метаболизма гомоцистеина

возникает гипергомоцистеинемия. В метилировании большую роль играет фолатный цикл (см. рис. 1), поскольку фолаты (формы витамина B9) являются кофакторами ферментов, участвующих в передаче метильной группы на различные молекулы, включающие ДНК, РНК, белки и многочисленные метаболиты.

В ходе фолатного цикла ферменты и их кофакторы обеспечивают превращение фолатов в активную форму, которая образуется путем присоединения к ним донора метильных групп, такого как SAM. Далее активные формы фолатов уже могут передавать свои метильные группы на целевые молекулы, стимулируя тем самым ход реакций метилирования [8]. Известно, что реакции метилирования, контролируемые фолатным циклом, важны для нормального функционирования организма и могут быть связаны с различными биологическими процессами, включая рост и развитие, репликацию ДНК, регуляцию экспрессии генов и поддержание стабильности генома, что особо актуально в контексте противоопухолевой резистентности [9].

Нарушение фолатного цикла может привести к снижению уровня активной формы фолата — 5-метилтетрагидрофолата (5-MTHF), необходимого для поддержания цикла метионина. Наиболее частыми причинами снижения образования 5-MTHF являются гено- и аллель-ассоциированные полиморфизмы фермента метилтетрагидрофолатредуктазы (MTHFR EC 1.5.1.20), которые могут привести к изменению ее активности [10]. MTHFR — это фермент, катализирующий конверсию 5,10-метилтетрагидрофолата в 5-MTHF.

Основными генетическими причинами гипергомоцистеинемии являются однонуклеотидные полиморфизмы в гене *MTHFR*. В нем обнаружены около 14 различных вариаций, влияющих на функцию кодируемого фермента [11]. Наиболее изученный вариант — замена цитозина на тимин в позиции 677. Такой полиморфизм гена *MTHFR* обозначается как C677T. Еще одним вариантом полиморфизма является замена аденина на цитозин в позиции 1298 (обозначается как A1298C), которая приводит к изменению структуры фермента — глутаминовая кислота в позиции 429 заменяется на аланин. Носительство каждого из полиморфных вариантов гена в гомо- и гетерозиготном видах в той или иной степени снижает активность MTHFR, а комбинация указанных генотипов сопровождается не только выраженным уменьшением активности фермента, но и увеличением концентрации гомоцистеина в плазме крови [12].

Наиболее распространенным негенетическим фактором, приводящим к нарушению регуляции метионинового цикла, является недостаток фолиевой кислоты и витамина B12. Оба этих витамина играют большую роль в обмене гомоцистеина, функционируя в качестве кофакторов фермента MS, который превращает гомоцистеин в метионин путем реметилирования с использованием 5-метилтетрагидрофолата в качестве донора метила. Избыток циркулирующего

гомоцистеина может быть утилизирован и иным альтернативным путем — транссульфурацией до цистеина, который может использоваться для синтеза универсального клеточного антиоксиданта глутатиона при участии пиридоксина (витамина В6). В связи с этим недостаточное потребление с пищей фолиевой кислоты, витаминов В12 и В6 или проблемы, обусловленные нарушением всасывания данных веществ и трансмембранного переноса, являются основными факторами, влияющими на уровень гомоцистеина; при высоком потреблении метионина эти проблемы усугубляются [13, 14].

Установлено, что накопление гомоцистеина в крови повышает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта, деменции и способствует развитию злокачественных новообразований (ЗНО) [15]. В научных публикациях содержится значительное количество данных о влиянии нарушений метионинового цикла на появление сердечно-сосудистой патологии [16, 17], тем не менее роль таких нарушений в возникновении ЗНО недостаточно исследована. Поэтому цель данного обзора — обобщить и представить данные современных исследований о роли нарушения регуляции метионинового катаболизма в процессе канцерогенеза.

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА МЕТИОНИНА В ИНИЦИАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Нарушения цикла «метионин — гомоцистеин» в организме человека все чаще соотносят с возникновением опухолевой трансформации клеток. Вышеуказанный биохимический процесс связан с контролем окислительно-восстановительных реакций, включая те, которые происходят в генетическом аппарате клетки. Метионин, обратимо окисляясь и восстанавливаясь, играет большую роль в функционировании антиоксидантной системы [18]. При окислении метионина образуется сульфоксид метионина, который затем восстанавливается обратно до метионина при участии ферментов метионинсульфоксид-редуктаз [19]. Восстановление редуктазами позволяет метионину многократно реагировать с окислителями, образуя систему с каталитической эффективностью для удаления реакционноспособных веществ. Таким образом, один остаток метионина может быть многократно окислен и восстановлен, что делает эту аминокислоту эффективным антиоксидантом. При нарушении реметилирования гомоцистеина происходит снижение уровня метионина, что приводит к интенсификации окислительных процессов в ядре клетки, включая окисление гуанина до мутагенного 8-оксигуанина [20]. Исследования показали, что производные некоторых аминокислот, включая метионин, эффективно восстанавливают гуанильные радикалы, образующиеся при воздействии γ -излучения на плазмидную ДНК [21].

В результате нарушения реметилирования происходит не только истощение метионина, но и повышение

уровня гомоцистеина в организме, что приводит к развитию гипергомоцистеинемии. Считается, что именно гомоцистеин является связующим звеном между нарушением метаболизма метионина и развитием ЗНО. Повышенный уровень гомоцистеина связан с риском возникновения различных видов ЗНО, включая рак молочной железы, предстательной железы, желудка и др. [17]. Гомоцистеин, в отличие от метионина, усиливает выраженность окислительного стресса в клетке. Он может оказывать влияние на формирование активных форм кислорода через несколько механизмов. Один из них связан с эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS, EC 1.14.13.39) и реализуется в клетках эндотелия сосудов, в результате чего возникает эндотелиальная дисфункция. В этом процессе повышенный уровень гомоцистеина способствует увеличению активности eNOS и усиленной выработке оксида азота, который взаимодействует с супероксид-ионом и формирует пероксинитрит [4]. В свою очередь, пероксинитрит, являясь реактивной формой кислорода, может играть большую роль в инициации канцерогенеза — вызывать повреждения ДНК, белков и липидов в клетках, приводя к воспалению и нарушению баланса антиоксидантной системы в организме.

Высокая скорость окисления аминотиолов в плазме также способствует увеличению образования активных форм кислорода. Гомоцистеин, находящийся как в плазме крови, так и внутриклеточно, способен окислять аминотиолы с антиоксидантными свойствами — глутатион и меркаптальбумин, приводя к образованию дисульфидных связей, что способствует синтезу активных форм кислорода. Кроме того, гомоцистеин может также ингибировать активность ферментов, которые восстанавливают окисленные аминотиолы обратно в их активную форму [16].

Гомоцистеин способен непосредственно оказывать негативное воздействие на активность двух ключевых антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы (SOD, EC 1.15.1.1) и глутатионпероксидазы (GPx, EC 1.11.1.9). Это, в свою очередь, приводит к накоплению активных форм кислорода и окислительному стрессу в организме. Гомоцистеин не только взаимодействует напрямую с SOD и ингибирует ее активность, но и способен конкурировать с ионами металлов, необходимыми для активации SOD, и занимать их место в активном центре фермента, что приводит к снижению активности последнего [22]. Кроме того, гомоцистеин может конкурировать с глутатионом за доступ к GPx и снижать ее активность [23]. Помимо этого, гипергомоцистеинемия сопровождается усилением выраженности окислительного стресса в эндотелиоцитах и приводит к активации в них провоспалительных сигнальных механизмов, в частности транскрипционного ядерного фактора κ B (NF- κ B) [22]. Кроме того, избыточный уровень гомоцистеина обладает способностью активировать сигнальные каскады PKC (протеинкиназа C), CaM (кальмодулин),

МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы) и NF-κB [24]. Перечисленные внутриклеточные механизмы участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток, а их гиперактивация сопряжена с опухолевой инициацией и прогрессией [25, 26].

Дефицит метионина и избыток гомоцистеина могут вносить вклад в развитие ЗНО и через эпигенетические механизмы. Метаболические пути метионина играют критическую роль в регулировании уровня метилирования ДНК, при этом нарушение регуляции может возникнуть на разных этапах метаболизма метионина. В первую очередь это может произойти из-за дефицита метионина, который, как уже неоднократно упоминалось, является фактором, необходимым для синтеза SAM. SAM, в свою очередь, напрямую способен влиять на метилирование ДНК посредством взаимодействия с ДНК-метилтрансферазами, которые переносят метильные группы на цитозиновые остатки в ДНК, образуя 5-метилцитозин [27]. Образование 5-метилцитозина в промоторных областях гена может препятствовать связыванию транскрипционных факторов и таким образом подавлять экспрессию разнообразных генов [28, 29]. При канцерогенезе глобальное гипометилирование, возникающее при дефиците метионина, особенно опасно в промоторных областях генов, которые отвечают за контроль роста клеток и репарацию ДНК, и может быть связано с повышенным риском развития ряда ЗНО из-за активации экспрессии онкогенов [3]. Например, сообщается, что SAM способствует ингибированию пролиферации клеток рака желудка и толстой кишки, изменяя статус гипометилирования широко известных научной обществу онкогенов *c-myc* и *H-ras* [30].

Кроме того, глобальное гипометилирование ДНК может приводить к геномной нестабильности, так как оно способствует активации транспозонов и эндогенных ретровирусных элементов человека (HERV). Такие события, в свою очередь, могут вызвать мутации и хромосомные перестройки [31]. В частности, описана устойчивая сверхэкспрессия множества HERV в клеточных линиях глиобластомы, включая ретровирусный транскрипт *HML-6*, локализованный в длинном плече 19-й хромосомы (19q13.43b). При этом экспрессия человеческих эндогенных ретровирусов обратно коррелирует с локуспецифичным метилированием ДНК [32].

Однако во многих типах опухолей частота геномных перестроек не коррелирует со степенью гипометилирования ДНК. Это позволяет предположить, что данное эпигенетическое изменение способствует инициации опухоли другими способами. Таким образом, преобладающей гипотезой о роли гипометилирования ДНК в инициации и прогрессировании опухолей остается транскрипционная активация онкогенов [33].

Еще одним нарушением метаболизма метионина, существенно влияющим на метилирование, является нарушение реметилирования гомоцистеина в метионин с накоплением последнего. В свою очередь,

гомоцистеин представляет собой мощный ингибитор метилтрансфераз [34]; он усугубляет гипометилирование, эффекты которого были обозначены ранее. Указанные этапы нарушения метаболизма метионина обычно имеют сочетанный характер и изменяют соотношение метионина и гомоцистеина.

Согласно данным литературы нет однозначных убедительных фактов о прямом влиянии избытка метионина на локальное гиперметилирование генов, которое часто ассоциируется с генетическим «молчанием» и происходит в промоторных областях генов-супрессоров опухолей или других критически важных генов, что может привести к их отключению и способствовать канцерогенезу. Вероятно, это связано со сложной регуляцией взаимопревращения метионина в гомоцистеин. Тем не менее гиперметилирование, вызванное иными факторами, может способствовать опухолевой трансформации, если оно происходит в отношении ферментов, связанных с метиониновым циклом. В частности, с использованием двух независимых методов обнаружено повышенное метилирование ДНК 5'-регуляторных областей ключевых генов метаболизма метильных групп *ODC*, *AHCU* и *MTHFR* при уротелиальной карциноме ранней стадии, вследствие которого перечисленные гены оказались эпигенетически подавлены, что привело к снижению их транскрипционной активности. Поразительно, что данные события гиперметилирования связаны с тотальным гипометилированием ДНК во всем геноме опухолевых клеток. Это предопределяет новую гипотезу в отношении развития уротелиальной карциномы [35].

РОЛЬ НАРУШЕНИЯ ЦИКЛА «МЕТИОНИН – ГОМОЦИСТЕИН» В МЕХАНИЗМАХ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Метаболическая гибкость является важной характеристикой опухолевых клеток, что позволяет им быстро реагировать и адаптироваться к меняющимся условиям микроокружения. Такие особенности метаболизма способствуют прогрессированию опухолей и развитию метастазирования [36].

Метионин является незаменимой аминокислотой, необходимой для обмена в нормальных клетках. Однако при ускоренном росте и делении клеток, что характерно для опухолей, потребность клеток в метионине значительно возрастает. Установлено, что уровень метионина в плазме крови у онкологических больных ниже, чем у здоровых доноров, а опухолевые клетки, обладая измененным метаболизмом, потребляют большее количество аминокислот, включая триптофан и метионин, тем самым ограничивая поступление последнего в нормальные клетки (например, Т-лимфоциты), ухудшая функцию последних и приводя к снижению противоопухолевого иммунного ответа. В частности, на модели колоректального рака мышей установлено, что опухолевые клетки за счет

повышенной экспрессии транспортера метионина SLC43A2 снижают уровни метионина и S-доноров метильных групп, таких как SAM, в окружающей метаболической среде. Сложившийся дефицит данных факторов неблагоприятно сказывается на функционировании CD8⁺-Т-клеток из-за потери метилирования H3K79 на лизине в гистоне H3 (H3K79me2) в этих клетках. Генетическое и биохимическое ингибирование SLC43A2, а также добавление метионина к рациону животных восстанавливает метилирование гистонов в Т-клетках, тем самым повышая спонтанный и индуцированный противоопухолевый иммунитет у мышей-носителей опухоли. Подобные эффекты наблюдались и у пациентов с раком толстого кишечника. В связи с этим поглощение метионина опухолью может быть недооцененным механизмом опухолевой прогрессии посредством уклонения клеток от системы иммунобиологического надзора [37]. Эффект влияния экзогенного метионина на клетки может иметь специфическую природу, которая характерна лишь для определенных видов неопластических клеток. Интересно, что, в отличие от нормальных клеток, которые продолжают расти и оставаться жизнеспособными даже при продолжительном дефиците метионина, опухолевые клетки подвержены селективному подавлению роста при таких условиях. Этот феномен был назван эффектом Хоффмана и впервые описан в экспериментах при культивировании клеток остеогенной саркомы человека и нормальных фибробластов в отсутствие метионина [38].

Замена метионина на гомоцистеин в культуральной среде опухолевых клеток приводила к остановке роста клеток в S- и G2-фазах клеточного цикла. В то же время все клеточные линии нормальных фибробластов продолжали свой рост в такой среде. Таким образом, депривация метионина позволила усилить метаболические различия между нормальными и опухолевыми клетками, что при дальнейшем добавлении противоопухолевых препаратов — доксорубинина и винкристина — привело к полной гибели 1 клеточной линии остеогенной саркомы человека и 3 линий опухолевых клеток человека: клеток рака предстательной железы, легкого и молочной железы. Эти результаты позволили сделать вывод о возможной метиониновой зависимости опухолевых клеток, которая объясняется тем, что ускоренные темпы пролиферации требуют большого количества белков и нуклеиновых кислот, ключевую роль в синтезе которых играет SAM. В целом такие метаболические особенности опухолевых клеток демонстрируют потенциал для повышения эффективности химиотерапии [38].

Подобная метиониновая зависимость выявлена в клетках как исследованных клеточных линий рака предстательной железы, молочной железы, мочевого пузыря, толстого кишечника, почечно-клеточного рака, глиомы, меланомы, некоторых гемобластозов, так и первичных клеточных культур упомянутых ЗНО, полученных от пациентов [39].

Специфические метаболические изменения, возникающие в обмене метионина в опухолевых клетках, связывают с рядом генетических и эпигенетических изменений. Метаболомный анализ опухоль-иницирующих клеток выявил повышенную активность метионинового цикла и транسمетилирования, регулируемых MAT2A [40]. Этот фермент участвует в превращении метионина в SAM, который затем используется как донор метильных групп, необходимых для регуляции экспрессии генов и модификации белков [41]. Высокая активность данного цикла в опухолевых клетках приводит к неудовлетворенной потребности в метионине, превышающей его уровень в организме, и обуславливает зависимость опухолевых клеток от внешнего поступления метионина. Именно на основе этого утверждения разработаны противоопухолевые стратегии, в основе которых лежит ограничение поступления метионина с пищей, что позволило уменьшить степень прогрессирования некоторых типов опухолей. Так, в эксперименте ограничение приема метионина повышало терапевтический ответ на двух моделях резистентного к химиотерапии рака толстого кишечника, полученных от пациентов, и на мышинной модели саркомы мягких тканей с мутацией G12D в KRAS и нокаутом P53 (KRASG12D/+; TRP53-/-), устойчивой к лучевой терапии [42]. Кроме того, обнаружено, что снижение содержания метионина в пище увеличивает продолжительность жизни животных разных видов: крыс, мышей и плодовых мушек [43]. На метаболической уязвимости, лежащей в основе эффекта Хоффмана, разработана еще более действенная противоопухолевая стратегия, которая наряду с диетическим ограничением, отдельно или в сочетании с химиотерапевтическим лечением, включает применение метиониназы (METase, EC 4.4.1.11), катализирующей реакцию элиминации метионина в сыворотке крови. Результаты клинических исследований показали эффективность применения METase, в том числе при пероральном приеме, у пациентов с гормоннезависимым раком предстательной, поджелудочной желез, яичников, прямой кишки и инвазивным дольковым раком молочной железы [6, 44].

Однако, несмотря на многочисленные исследования, механизмы регулирования продолжительности жизни с помощью ограничения поступления с пищей источников метионина, которыми являются мясо, рыба, птица, яйца, молоко, сыры и орехи, остаются не до конца понятными. Предполагается, что эффективность стратегии сокращения метионина в рационе питания с целью увеличения продолжительности жизни основана на снижении активации mTOR-сигналинга (mTOR — мишень рапамицина млекопитающих), являющегося ключевым в системе контроля роста клеток, в том числе при инициации канцерогенеза. Исследования на модельных организмах, таких как дрозофилы, показывают, что подавление активности mTOR-сигналинга может способствовать увеличению продолжительности жизни.

Ограничение поступления метионина с пищей приводило к повышению экспрессии ингибиторов mTOR — белков туберина и гамартина, что увеличивало продолжительность жизни дрозофил [45].

Кроме того, сообщается, что увеличение продолжительности жизни и замедление старения при ограничении поступления метионина с пищей также может быть связано со снижением активации сигнального пути инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) — эволюционно сохранившегося механизма, регулирующего продолжительность жизни [46]. Показано, что фармакологическое ингибирование цикла метионина приводит к нарушению способности клеток инициировать опухоль, что установлено на ксенографтах двух линий немелкоклеточного рака легкого с высоким содержанием опухолевых стволовых клеток. Даже кратковременное — на 48-часовой период — лишение клеток метионина в эксперименте приводило к снижению опухоль-иницирующей способности, что связано с формированием стойких эпигенетических изменений, характеризующихся снижением уровня метилирования гистонов семейства H3 (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me2, H3K36me3 и H3K79me3) [40].

Тем не менее стратегия ограничения поступления метионина уже при наличии в организме ЗНО может оказаться малоэффективной. Несмотря на то, что он является незаменимой аминокислотой и организм должен получать его из пищи а также описан феномен метиониновой зависимости ряда опухолевых клеток, другие злокачественные клетки вполне способны преодолевать это ограничение. Почему некоторые опухолевые клетки остаются или становятся независимыми от метионина, до конца не изучено. Есть предположение, что это связано с развитием альтернативных путей его синтеза, активирующихся во время опухолевой прогрессии. Например, клетки опухоли могут использовать другие аминокислоты, такие как серин и глицин, для синтеза метионина через цикл метионин — серин — глицин, катализируемый ферментом цистатионин-β-синтазой (CBS, EC 4.2.1.22). Кроме того, некоторые опухолевые клетки экспрессируют CBS в повышенных количествах, что позволяет им синтезировать метионин даже при его низком уровне в рационе, и это условие помогает злокачественной опухоли эффективно пролиферировать [47].

Примечательно, что при длительном культивировании метионинзависимых опухолевых клеток в среде, где метионин заменен на гомоцистеин, могут быть отобраны единичные клеточные клоны, которые вернулись к независимости от метионина. Большинство из этих метиониннезависимых клонов утрачивают свойства, связанные с онкогенным состоянием, и этот факт указывает на тесную взаимосвязь метиониновой зависимости и онкогенности [48, 49].

С учетом возможности опухоли преодолевать метиониновую зависимость в ходе исследования F. Li и соавт. выполнялась не только полная депривация

метионина, но и блокирование его метаболизма с помощью ингибирования MAT2A в клетках злокачественной карциномы печени. Установлено, что только в комбинации эти манипуляции приводили к остановке клеточного цикла в опухолевых клетках с дальнейшим приобретением последних признаков клеточного старения [50]. Вместе с тем о роли метаболизма метионина в регуляции переключения фенотипов опухолевых клеток из активно пролиферирующих в дремлющие (медленно пролиферирующие) и наоборот имеется очень мало информации, и конкретные механизмы этого не установлены. Есть сообщения о влиянии уровня внутриклеточного SAM на процессы репрограммирования эмбриональных клеток мышей. Выявлено, что старение клеток приводит к снижению уровня SAM из-за его ускоренной конверсии в SAH и увеличения экспрессии и активности никотинамид-N-метилтрансферазы (NNMT, EC 2.1.1.1), потребляющей SAM. В экспериментах на мышинных эмбрионах, где блокировалось образование SAM с помощью ингибирования фермента MAT2A, обнаружено, что эти события приводят к уменьшению выраженности перехода клеток в тотипотентное состояние [51].

Известно, что уровень экспрессии MAT2A значительно повышен в клетках некоторых видов ЗНО, что связано с более агрессивным течением заболевания. Например, данные, полученные в ходе мультиомного (протеомного и метаболомного) исследования клеток рака мочевого пузыря, устойчивых к цисплатину, показали их зависимость от MAT2A-опосредованного метаболизма метионина у цисплатин-резистентных опухолевых клеток. Биоинформатический анализ результатов метаболомного исследования выявил изменение разнообразных метаболических путей, включающих метаболизм метионина, глюкогона, глицина, серина, гистидина, глутамина и цикла трикарбоновых кислот. Однако при согласовании метаболомного профиля с протеомным наиболее высокоэкспрессируемыми оказались ферменты метаболизма именно метионина, в частности MAT2A [52].

Дальнейшие эксперименты, проведенные на животных, подтвердили эффективность подавления метаболизма метионина в преодолении резистентности к цисплатину [52, 53]. Выявлено, что устойчивость клеток рака мочевого пузыря к этому препарату зависит от нескольких факторов, включая повышенную экспрессию гена *MAT2A* и низкий уровень экспрессии гена *circARHGAP10*, функция которого состоит в усилении деградации MAT2A через убиквитин-протеасомный путь. В эксперименте на мышинной иммунодефицитной модели рака мочевого пузыря исследователям удалось преодолеть устойчивость к цисплатину *in vivo* путем повышения экспрессии гена *circARHGAP10* [52].

Кроме того, в ходе исследования на мышах с гепатоцеллюлярной карциномой, индуцированной низким содержанием жиров в рационе, продемонстрирована

связь между развитием злокачественной опухоли и повышением экспрессии *MAT2A* [53]. В данном эксперименте активность *MAT2A* регулировали с помощью добавления в пищевой рацион фолатов. Диета с их высоким содержанием приводила к увеличению уровня экспрессии *MAT2A* и способствовала развитию индуцированного рака печени. И наоборот, исключение из рациона продуктов с содержанием фолиевой кислоты вызывало снижение экспрессии гена *MAT2A* и препятствовало канцерогенезу. Интересно, что метаболизм метионина динамически перепрограммируется посредством валозинсодержащего белка, который комплексно взаимодействует с белком p97/p47 (VCIP135) и функционирует как деубиквитирующий фермент для связывания и стабилизации *MAT2A* в ответ на сигнал фолиевой кислоты [53].

Считается, что *MAT2A*-опосредованная опухолевая прогрессия вызывается нарушениями в клетке, происходящими на различных уровнях регуляции. Например, факторы транскрипции, такие как Sp1, c-Myc, NF-κB и AP-1, способны усиливать транскрипцию *MAT2A* в клетках гепатоцеллюлярной карциномы. В отличие от нормальных гепатоцитов в клетках рака печени в промоторной области гена *MAT2A* идентифицирован участок, устойчивый к деградации ДНКазой I, непосредственно взаимодействующий с указанными выше транскрипционными факторами [54, 55].

Кроме того, посттрансляционные модификации, такие как нарушения в ацетилировании и убиквитилировании, тоже связаны с канцерогенезом и обнаружены в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [41]. Стоит отметить, что уровень экспрессии *MAT2A* повышается при низком уровне экзогенного метионина в клетке, что демонстрирует регуляцию биосинтеза SAM в отдельных клетках для поддержания его оптимальных уровней с целью обеспечения процесса метилирования, а также других биохимических реакций [56].

Метионин, помимо своих основных функций, оказывает влияние на различные метаболические процессы, включая метаболизм липидов. Установлено, что некоторые опухолевые клетки используют метионин в качестве источника для синтеза спермидина — полиамина, способствующего пролиферации и выживаемости клеток [3]. Помимо этого, окисление метионина аллостерически регулирует активность пируваткиназы M2 (PKM2, EC 2.7.1.40), что, в свою очередь, влияет на митохондриальное дыхание, миграцию опухолевых клеток и метастазирование. Это выявлено в ходе исследования прогрессирования аденокарциномы поджелудочной железы [57]. Результаты иммуногистохимического анализа тканей нормальной поджелудочной железы, первичной опухоли и вторичных метастазов протоковой аденокарциномы поджелудочной железы в печень показали, что экспрессия метионинсульфоредуктазы A (MSRA, EC 1.8.4.11),

снижающей количество окисленных остатков метионина, которые далее избирательно окисляются в PKM2, снижена в первичных опухолевых клетках по сравнению с соседними нормальными тканями и практически не обнаруживается при метастазах в печень. Более того, при таком MSRA-опосредованном окислении остатков метионина PKM2 поддерживается в активном тетрамерном состоянии, обеспечивая активность клеточных энергетических процессов и благодаря этому способствует миграции и метастазированию, что далее было установлено *in vivo* при фармакологической активации PKM2. Получается, что остатки метионина могут действовать как обратимые окислительно-восстановительные переключатели и служат регуляторной связью между редокс-статусом и метаболизмом опухолевой клетки в аспекте контроля метастазирования [57].

Гипергомоцистеинемия имеет отрицательное значение как фактор инициации опухолевого процесса, а также связана с прогрессированием уже существующей опухоли. Высокий уровень гомоцистеина может вызывать рост опухоли путем влияния на неоангиогенез из-за способности принимать участие в активации фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Данный факт зарегистрирован в неопухолевых клетках (линия клеток пигментного эпителия сетчатки), в которых гомоцистеин индуцировал экспрессию матричной РНК VEGF-зависимым от времени и дозы образом [58]. Тем не менее в исследовании, в которое вошли 56 пациентов с раком желудка и 53 пациента с предраковыми изменениями слизистой оболочки желудка, установлены более высокие уровни гомоцистеина и 3 изоформ VEGF (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D) в сыворотке крови у больных с данными патологиями по сравнению с участниками контрольной группы. При этом высокие уровни экспрессии перечисленных маркеров имели положительные корреляционные взаимосвязи со стадией метастазирования (по классификации Tumor, Nodus and Metastasis), гистологическим типом опухоли по классификации Lauren (1965) и глубиной опухолевой инвазии [59].

Сводные данные о влиянии основных нарушений метионинового цикла на появление и прогрессирование злокачественных опухолей представлены в табл. 1.

Также хочется затронуть еще одну важную проблему — нарушение цикла метионина при химиотерапевтическом лечении ЗНО. В ходе химиотерапии могут проявиться факторы, влияющие на цикл метионина. Во-первых, противоопухолевые препараты в ряде случаев оказывают непосредственное воздействие на метаболизм метионина, вызывая гипергомоцистеинемия. Известно, что фолиевая кислота играет большую роль в синтезе пуринов, которые являются компонентами ДНК и РНК. Активно делящиеся опухолевые клетки потребляют большое количество пуринов

Таблица 1. Влияние ключевых нарушений метионинового цикла на возникновение и развитие злокачественных опухолей
 Table 1. The influence of key disorders of the methionine cycle on the occurrence and development of malignant tumors

Характеристика нарушений Characteristics of the disorder	Влияние на инициацию опухоли Effect on tumor initiation	Влияние на прогрессию опухоли Effect on tumor progression	Источник Source
<p>Дефицит метионина из-за нарушения его поступления в организм, повышения захвата и использования клетками, а также нарушения реметилирования гомоцистеина Methionine deficit due to its abnormal intake into the body, increased uptake and utilization by the cells, as well as abnormal homocysteine re-methylation</p>	<p>Интенсификация окислительных процессов в ядре клетки: накопление мутагенного 8-оксигуанина. Дефицит метионина как мощного антиоксиданта, приводящий к снижению восстановления гуанильных радикалов. Intensification of oxidative processes in the cell nucleus: accumulation of mutagenic 8-oxoguanine. Deficit of methionine as a powerful antioxidant leading to decreased reduction of guanyl radicals.</p> <p>Эпигенетические нарушения вследствие снижения образования S-аденозилметионина (SAM): — глобальное гипометилирование из-за снижения образования 5-метилицозина, следствием которого является активация экспрессии онкогенов; — геномная нестабильность вследствие гипометилирования ДНК (активация транспозонов и эндогенных ретровирусных элементов человека (HERV)) Epigenetic abnormalities due to decreased production of S-adenosyl methionine (SAM): — global hypomethylation due to decreased production of 5-methylcytosine leading to activation of oncogene expression; — genomic instability due to DNA hypomethylation (transposons and human endogenous retroviral (HERV) elements)</p>	<p>Пролiferация и выживаемость: — метиониновая зависимость опухоли, обусловленная высокой экспрессией <i>MAT2A</i>. Это необходимо клеткам опухоли для превращения метионина в SAM как донора метильных групп для обеспечения потребности опухоли в росте, репликации ДНК и регуляции экспрессии онкобелков. Факторы транскрипции Sp1, c-Myc, AP-1 и транскрипционный ядерный фактор κB (NF-κB) усиливают транскрипцию <i>MAT2A</i> в опухоли; — метионин приводит к образованию полиамина спермидина, способствующего пролиферации и выживаемости клеток. Proliferation and survival: — methionine dependence of the tumor caused by high <i>MAT2A</i> expression. This is necessary for tumor cells for converting methionine into SAM as a donor of methyl groups supplying the tumor with resources for increased DNA replication and oncogene protein regulation. Transcription factors Sp1, c-Myc, AP-1 and transcription nuclear factor κB (NF-κB) increase tumor <i>MAT2A</i> transcription; — methionine leads to formation of polyamine spermidine which promotes cell proliferation and survival.</p> <p>Метастазирование: остатки метионина в опухолевых клетках действуют как окислительно-восстановительные переносчики в аспекте контроля метастиазирования и регулируют активность РКМ2, которая приводит к активации миграции и метастазирования опухолевых клеток. Metastasis: in tumor cells, methionine residues serve as redox switches in metastasis control and regulate PKM2 activity which activates migration and metastasis of tumor cells.</p> <p>Снижение противоопухолевого иммунного ответа в результате «обкрадывания» метионином опухолевыми клетками иммунных клеток. Decreased antitumor immune response due to tumor cells “snatching” methionine from immune cells.</p> <p>Резистентность к противоопухолевым препаратам — описана для цисплатина, связана с повышенной экспрессией <i>MAT2A</i> и низким уровнем экспрессии гена <i>cisARNHGAP10</i>, функция которого состоит в усилении деградации <i>MAT2A</i> через убиквитин-протеасомный путь Resistance to antitumor drugs: was described for cisplatin, is associated with increased <i>MAT2A</i> expression and low expression of the <i>cisARNHGAP10</i> gene whose function is to increase <i>MAT2A</i> degradation through the ubiquitin- proteasome pathway</p>	<p>13, 4, 20, 30–33, 37–39, 42, 52–55, 571</p>

Характеристика нарушений Characteristics of the disorder	Влияние на инициацию опухоли Effect on tumor initiation	Влияние на прогрессию опухоли Effect on tumor progression	Источник Source
<p>Гипергомоцистеинемия в результате нарушений реметилирования, трансульфатации, возникающих в том числе из-за дефицита витаминов В6, В9 и В12 вследствие нарушения их поступления, всасывания, а также образования активных форм данных ВИТАМИНОВ</p> <p>Hyperhomocysteinemia caused by abnormal re-methylation, transsulfation developing due to, among other factors, B6, B9 and B12 vitamin deficiency as a result of their abnormal intake, absorption, and formation of their active forms</p>	<p>Окислительный стресс, вызванный повышенным уровнем гомоцистеина, поскольку гомоцистеин способен:</p> <ul style="list-style-type: none"> — влиять на эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), усиливая выработку оксида азота, который взаимодействует с супероксид-ионом, формируя свободный радикал пероксинитрит; — окислять аминокислоты с антиоксидантными свойствами (глутатион и меркапталбумин); — ингибировать активность ферментов, которые восстанавливают окисленные аминокислоты обратно в их активную форму; — снижать активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы или полностью их ингибировать; — активировать провоспалительные сигнальные каскады. <p>Oxidative stress caused by increased homocysteine level because homocysteine can:</p> <ul style="list-style-type: none"> — affect endothelial nitrogen oxide synthase (eNOS) increasing production of nitrogen oxide which interacts with superoxide ion forming free radical peroxynitrite; — oxidate aminothiols with antioxidant properties (glutathione and mercaptalbumin); — inhibit activity of enzymes which reduce oxidized aminothiols back to their active form; — decrease superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity or completely inhibit them; — activate proinflammatory signaling cascades. <p>Эпигенетические нарушения: ГОМОЦИСТЕИН ингибирует метилтрансферазы, вызывая глобальное гипометилирование, что увеличивает вероятность активации экспрессии онкогенов</p> <p>Epigenetic abnormalities: homocysteine inhibits methyltransferases causing global hypomethylation which increases the likelihood of oncogene expression</p>	<p>Неоангиогенез: гомоцистеин способствует росту опухоли путем влияния на неоангиогенез посредством активации фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)</p> <p>Neovascularization: homocysteine promotes tumor growth through activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its subsequent effect on neovascularization</p>	<p>[5, 16, 22, 24–26, 34, 58, 59]</p>
	<p>Активация сигнальных каскадов, участвующих в канцерогенезе: гомоцистеин активирует сигнальные каскады РКК, СаМ, МАРК и NF-κВ</p> <p>Activation of signaling cascades participating in carcinogenesis: homocysteine activates the PKC, CaM, MAPK and NF-κB signaling cascades</p>		

для синтеза нуклеиновых кислот и активно используют фолиевую кислоту, содержащуюся в крови, что приводит к снижению ее уровня у онкологических пациентов. Кроме того, некоторые химиотерапевтические препараты, такие как алкилирующие агенты, антиметаболиты, метотрексат, проявляют активность этой фолиевой кислоты, что усиливает выраженность гипергомоцистеинемии [16]. Во-вторых, химиотерапия может оказывать гепатотоксическое действие, а печень играет большую роль в обеспечении биохимических реакций, направленных на поддержание цикла метионина [4]. Совокупность названных факторов может усиливать побочные эффекты и снижать эффективность противоопухолевого лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нарушение метаболизма метионина, сопровождающееся развитием гипергомоцистеинемии, бесспорно, является фактором риска инициации канцерогенеза, а также поддерживает возникновение опухолевого роста через спектр разнообразных механизмов, включающих преимущественно окислительно-восстановительный дисбаланс, нарушение метаболических процессов, а также эпигенетическую регуляцию экспрессии онкогенов/онкосупрессоров (см. табл. 1). Контроль уровня этих аминокислот может быть потенциальной стратегией профилактики возникновения ЗНО, а также лежать в основе новых подходов противоопухолевого лекарственного воздействия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kim S., Fenech M.F., Kim P.J. Nutritionally recommended food for semi- to strict vegetarian diets based on large-scale nutrient composition data. *Sci Rep* 2018;8(1):4344. DOI: 10.1038/s41598-018-22691-1
- Jubenville É., Milad N., Maranda-Robitaille M. et al. Critical importance of dietary methionine and choline in the maintenance of lung homeostasis during normal and cigarette smoke exposure conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2021;319(2):L391–402. DOI: 10.1152/ajplung.00353.2019
- Sanderson S.M., Gao X., Dai Z., Locasale J.W. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(11):625–37. DOI: 10.1038/s41568-019-0187-8
- Li Z., Wang F., Liang B. et al. Methionine metabolism in chronic liver diseases: an update on molecular mechanism and therapeutic implication. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5(1):280. DOI: 10.1038/s41392-020-00349-7
- Austin R.C., Lentz S.R., Wörstuck G.H. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004;11(1):S56–64. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401451
- Покровский В.С., Або Кура Л., Демидова Е.А. и др. Метиониновая зависимость раковых клеток — мишень метиониназы. *Биохимия* 2023;88(7):1162–72. DOI: 10.31857/S0320972523070072 Pokrovsky V.S., Abo Kura L., Demidova E.A. et al. Methionine dependence of cancer cells is a target of methioninase. *Biokhimiya = Biochemistry* 2023;88(7):1162–72. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0320972523070072
- Muñoz-Esparza N.C., Latorre-Moratalla M.L., Comas-Bastó O. et al. Polyamines in food. *Front Nutr* 2019;6:108. DOI: 10.3389/fnut.2019.00108
- Mendoza J., Purchal M., Yamada K., Koutmos M. Structure of full-length cobalamin-dependent methionine synthase and cofactor loading captured in crystallo. *Nat Commun* 2023;14(1):6365. DOI: 10.1038/s41467-023-42037-4
- Blake G.E.T., Zhao X., Yung H.W. et al. Defective folate metabolism causes germline epigenetic instability and distinguishes Hira as a phenotype inheritance biomarker. *Nat Commun* 2021;12(1):3714. DOI: 10.1038/s41467-021-24036-5
- Suthandiram S., Gan G.G., Zain S.M. et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene and risk of non-Hodgkin lymphoma in a multi-ethnic population. *J Hum Genet* 2014;59(5):280–7. DOI: 10.1038/jhg.2014.19
- Wan L., Li Y., Zhang Z. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry* 2018;8(1):242. DOI: 10.1038/s41398-018-0276-6
- Reeves S.G., Meldrum C., Groombridge C. et al. MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Eur J Hum Genet* 2009;17(5):629–35. DOI: 10.1038/ejhg.2008.239
- Poursalehi D., Lotfi K., Mirzaei S. et al. Association between methyl donor nutrients and metabolic health status in overweight and obese adolescents. *Sci Rep* 2022;12(1):17045. DOI: 10.1038/s41598-022-21602-9
- Цеймах И.Я., Костюченко Г.И., Богачев Д.Е. и др. Эффекты фолиевой кислоты у больных с поражением легких, вызванным коронавирусом SARS-CoV-2. *Сибирское медицинское обозрение* 2021;(6):60–9. DOI: 10.20333/25000136-2021-6-60-69
- Tseimakh I.Ya., Kostyuchenko G.I., Bogachev D.E. Effect of folic acid in patients with lung damage caused by coronavirus SARS-CoV-2. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review* 2021;(6):60–9. (In Russ.). DOI: 10.20333/25000136-2021-6-60-69
- Xue Y., Lu F., Chang Z. et al. Intermittent dietary methionine deprivation facilitates tumoral ferroptosis and synergizes with checkpoint blockade. *Nat Commun* 2023;14(1):4758. DOI: 10.1038/s41467-023-40518-0
- Durand P., Prost M., Loreau N. et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81(5):645–72. DOI: 10.1038/labinvest.3780275
- Hasan T., Arora R., Bansal A.K. et al. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp Mol Med* 2019;51(2):1–13. DOI: 10.1038/s12276-019-0216-4
- Lim J.M., Kim G., Levine R.L. Methionine in Proteins: It's Not Just for Protein Initiation Anymore. *Neurochem Res* 2019;44(1):247–57. DOI: 10.1007/s11064-017-2460-0
- Weissbach H., Resnick L., Brot N. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703(2):203–12. DOI: 10.1016/j.bbapap.2004.10.004
- Ohno M., Takano N., Hidaka K. et al. Oxidative stress accelerates intestinal tumorigenesis by enhancing 8-oxoguanine-mediated mutagenesis in MUTYH-deficient mice. *Genome Res* 2024;34(1):47–56. DOI: 10.1101/gr.278326.123
- Milligan J.R., Aguilera J.A., Ly A. et al. Repair of oxidative DNA damage by amino acids. *Nucleic Acids Res* 2003;31(21):6258–63. DOI: 10.1093/nar/gkg816
- Zhang L., Xu R., Ma X. et al. Mechanism of arterial injury exacerbated by hyperhomocysteinemia in spontaneously

- hypertensive rats. *Sci Rep* 2023;13(1):2482. DOI: 10.1038/s41598-023-28731-9
24. Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. Homocysteine and glutathione peroxidase-1. *Antioxid Redox Signal* 2007;9(11):1923–40. DOI: 10.1089/ars.2007.1771
 25. Zeng X.K., Guan Y.F., Remick D.G., Wang X. Signal pathways underlying homocysteine-induced production of MCP-1 and IL-8 in cultured human whole blood. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(1):85–91. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2005.00005.x
 26. Villalobo A., Berchtold M.W. The Role of Calmodulin in Tumor Cell Migration, Invasiveness, and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2020;21(3):765. PMID: 31991573. DOI: 10.3390/ijms21030765
 27. You M., Xie Z., Zhang N. et al. Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):196. DOI: 10.1038/s41392-023-01442-3
 28. Kadam M.S., Burra V.L.S.P. S-adenosyl-L-methionine interaction signatures in methyltransferases. *J Biomol Struct Dyn* 2024;42(6):3166–76. DOI: 10.1080/07391102.2023.2217679
 29. Wu Y.L., Lin Z.J., Li C.C. et al. Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):98. DOI: 10.1038/s41392-023-01333-7
 30. Moore L.D., Le T., Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(1):23–38. DOI: 10.1038/npp.2012.112
 31. Luo J., Li Y.N., Wang F. et al. S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci* 2010;6(7):784–95. DOI: 10.7150/ijbs.6.784
 32. Kong Y., Rose C.M., Cass A.A. et al. Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nat Commun* 2019;10(1):5228. DOI: 10.1038/s41467-019-13035-2
 33. Shah A.H., Govindarajan V., Doucet-O'Hare T.T. et al. Differential expression of an endogenous retroviral element [HERV-K(HML-6)] is associated with reduced survival in glioblastoma patients. *Sci Rep* 2022;12(1):6902. DOI: 10.1038/s41598-022-10914-5
 34. Van Tongelen A., Lorient A., De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett* 2017;396:130–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.029
 35. Li G., Li D., Wu C. et al. Homocysteine-targeting compounds as a new treatment strategy for diabetic wounds via inhibition of the histone methyltransferase SET7/9. *Exp Mol Med* 2022;54(7):988–98. DOI: 10.1038/s12276-022-00804-1
 36. Erichsen L., Ghanjati F., Beermann A. et al. Aberrant methylated key genes of methyl group metabolism within the molecular etiology of urothelial carcinogenesis. *Sci Rep* 2018;8(1):6051. DOI: 10.1038/s41598-018-23158-z
 37. Soltani M., Zhao Y., Xia Z. et al. The importance of cellular metabolic pathways in pathogenesis and selective treatments of hematological malignancies. *Front Oncol* 2021;11:767026. DOI: 10.3389/fonc.2021.767026
 38. Bian Y., Li W., Kremer D.M. et al. Cancer SLC43A2 alters T cell methionine metabolism and histone methylation. *Nature* 2020;585(7824):277–82. DOI: 10.1038/s41586-020-2682-1
 39. Stern P.H., Hoffman R.M. Enhanced *in vitro* selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect. *J Natl Cancer Inst* 1986;76(4):629–39. DOI: 10.1093/jnci/76.4.629
 40. Sedillo J.C., Cryns V.L. Targeting the methionine addiction of cancer. *Am J Cancer Res* 2022;12(5):2249–76.
 41. Wang Z., Yip L.Y., Lee J.H.J. et al. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells. *Nat Med* 2019;25(5):825–37. PMID: 31061538. DOI: 10.1038/s41591-019-0423-5
 42. Yang H.B., Xu Y.Y., Zhao X.N. et al. Acetylation of MAT II α represses tumour cell growth and is decreased in human hepatocellular cancer. *Nat Commun* 2015;6:6973. DOI: 10.1038/ncomms7973
 43. Gao X., Sanderson S.M., Dai Z. et al. Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism. *Nature* 2019;572(7769):397–401. DOI: 10.1038/s41586-019-1437-3
 44. Lee B.C., Kaya A., Gladyshev V.N. Methionine restriction and life-span control. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1363:116–24. DOI: 10.1111/nyas.12973
 45. Abo Qoura L., Balakin K.V., Hoffman R.M., Pokrovsky V.S. The potential of methioninase for cancer treatment. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2024;1879(4):189122. DOI: 10.1016/j.bbcan.2024.189122
 46. Lee B.C., Kaya A., Ma S. et al. Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status. *Nat Commun* 2014;5:3592. DOI: 10.1038/ncomms4592
 47. Fontana L., Weiss E.P., Villareal D.T. et al. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell* 2008;7(5):681–7. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00417.x
 48. Wang L., Cai H., Hu Y. et al. A pharmacological probe identifies cystathionine β -synthase as a new negative regulator for ferroptosis. *Cell Death Dis* 2018;9(10):1005. DOI: 10.1038/s41419-018-1063-2
 49. Booher K., Lin D.W., Borrego S.L., Kaiser P. Downregulation of Cdc6 and pre-replication complexes in response to methionine stress in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2012;11(23):4414–23. DOI: 10.4161/cc.22767
 50. Borrego S.L., Lin D.W., Kaiser P. Isolation and characterization of methionine-independent clones from methionine-dependent cancer cells. *Methods Mol Biol* 2019;1866:37–48. DOI: 10.1007/978-1-4939-8796-2_4
 51. Li F., Liu P., Mi W. et al. Blocking methionine catabolism induces senescence and confers vulnerability to GSK3 inhibition in liver cancer. *Nat Cancer* 2024;5(1):131–46. DOI: 10.1038/s43018-023-00671-3
 52. Grigorash B.B., van Essen D., Liang G. et al. p16High senescence restricts cellular plasticity during somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* 2023;25(9):1265–78. DOI: 10.1038/s41556-023-01214-9
 53. Yang C., Ou Y., Zhou Q. et al. Methionine orchestrates the metabolism vulnerability in cisplatin resistant bladder cancer microenvironment. *Cell Death Dis* 2023;14(8):525. DOI: 10.1038/s41419-023-06050-1
 54. Li J.T., Yang H., Lei M.Z. et al. Dietary folate drives methionine metabolism to promote cancer development by stabilizing MAT IIA. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7(1):192. DOI: 10.1038/s41392-022-01017-8
 55. Yang H., Huang Z.Z., Wang J., Lu S.C. The role of c-Myb and Sp1 in the up-regulation of methionine adenosyltransferase 2A gene expression in human hepatocellular carcinoma. *FASEB J* 2001;15(9):1507–16. DOI: 10.1096/fj.01-0040com
 56. Yang H., Sadda M.R., Yu V. et al. Induction of human methionine adenosyltransferase 2A expression by tumor necrosis factor alpha. Role of NF-kappa B and AP-1. *J Biol Chem* 2003;278(51):50887–96. DOI: 10.1074/jbc.M307600200
 57. Strelakova E., Malin D., Weisenhorn E.M.M. et al. S-adenosylmethionine biosynthesis is a targetable metabolic vulnerability of cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat* 2019;175(1):39–50. DOI: 10.1007/s10549-019-05146-7
 58. He D., Feng H., Sundberg B. et al. Methionine oxidation activates pyruvate kinase M2 to promote pancreatic cancer metastasis. *Mol Cell* 2022;82(16):3045–60.e11. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.06.005
 59. Roybal C.N., Yang S., Sun C.W. et al. Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* 2004;279(15):14844–52. DOI: 10.1074/jbc.M312948200
 60. Zhao W.X., Liu Z.F., Li X.L., Li Z. Correlations of serum homocysteine, VEGF and gastrin 17 with gastric cancer and precancerous lesions. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23(10):4192–8. DOI: 10.26355/eurrev_201905_17922

Вклад авторов

Т.Г. Рукша, М.Н. Курбат: сбор, анализ и интерпретация данных литературы, написание текста статьи, научное редактирование;

Н.В. Палкина: сбор, анализ и интерпретация данных литературы, написание текста статьи;

В.А. Куценко: сбор, анализ и интерпретация данных литературы.

Authors' contributions

T.G. Ruksha, M.N. Kurbat: collection, analysis and interpretation of literature data, article writing, scientific editing;

N.V. Palkina: collection, analysis and interpretation of literature data, article writing;

V.A. Kutsenko: collection, analysis and interpretation of literature data.

ORCID авторов / ORCID authors

Т.Г. Рукша / T.G. Ruksha: <https://orcid.org/0000-0001-8142-4283>

М.Н. Курбат / M.N. Kurbat: <https://orcid.org/0000-0002-8518-2450>

Н.В. Палкина / N.V. Palkina: <https://orcid.org/0000-0002-6801-3452>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was completed without external funding.

Статья поступила: 18.06.2024. **Принята к публикации:** 03.09.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

Article submitted: 18.06.2024. **Accepted for publication:** 03.09.2024. **Published online:** 11.12.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-54-65>

Влияние нового ингибитора HSP90 на сигнальные пути рецептора эстрогенов α в клетках рака молочной железы

А.М. Щербаков^{1,2}, Д.В. Сорокин¹, Д.И. Сальникова^{1,3}, М.В. Гудкова¹, О.Е. Андреева¹, А.Л. Михайлова¹, А.О. Воробьева⁴, Ю.А. Пивень⁴

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

²ФГБУН «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»; Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11;

³ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, Ленинский пр-кт, 47;

⁴ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»; Беларусь, 220084 Минск, ул. Академика Куревича, 5/2

Контакты: Александр Михайлович Щербаков alex.scherbakov.2010@ya.ru

Введение. Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP), также известные как молекулярные шапероны, представляют собой большое семейство белков, регулирующих процессы гистогенеза и гомеостаза, а также влияющих на фолдинг и функциональную активность множества клиентских белков. Особый интерес в этом семействе представляет шаперон 90 (HSP90), который значительно поддерживает рост злокачественных клеток. Он оказывает комплексное влияние на сигнальные пути канцерогенеза, включая BCR-ABL, Raf-1, AKT, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (ERBB2/HER2), индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α), янус-киназу 2 (JAK2), STAT3, p53 и рецептор эстрогена α (ER α). Именно поэтому поиск новых селективных ингибиторов этого шаперона является актуальной задачей медицинской химии и онкологии.

Цель исследования – изучение антипролиферативной активности нового ингибитора HSP90 THB5T-1 на линиях клеток ER α -положительного рака молочной железы и оценка его антиэстрогенного потенциала и селективности.

Материалы и методы. Исследование проводили на линиях гормонозависимых клеток рака молочной железы MCF7 и T47D и нормальных фибробластов hFB-hTERT. Антипролиферативную активность соединения определяли посредством МТТ-теста. Для анализа влияния ингибирования HSP90 на сигнальные пути клеток использовали иммуноблоттинг. Оценка антиэстрогенной активности THB5T-1 проводили в клетках MCF7 методом репортерного анализа. Для построения модели взаимодействия THB5T-1 с лигандсвязывающим доменом ER α применяли молекулярное моделирование.

Результаты. Концентрация THB5T-1, необходимая для полумаксимального ингибирования роста клеток (IC₅₀), составила 4,3 мкМ для линии MCF7 и 5,6 мкМ для линии T47D. Увеличение концентрации THB5T-1 до 25 мкМ приводило к снижению выживаемости клеток до 20 %. Индекс селективности THB5T-1 для различных клеток рака молочной железы варьировал от 3,7 до 5 у.е. Влияние соединения THB5T-1 на гормональные пути в клетках MCF7, выявленное с помощью репортерного анализа и иммуноблоттинга, оказалось дозозависимым. Способность THB5T-1 напрямую связываться с ER α подтверждена данными молекулярного моделирования. Антипролиферативные эффекты THB5T-1 в клетках MCF7 ассоциированы со снижением экспрессии регуляторов клеточного цикла, таких как циклин D1 и циклин-зависимая киназа 4 (CDK4). Также выявлена значительная эффективность соединения THB5T-1 в комбинации с селективным ингибитором AKT.

Заключение. Соединение THB5T-1 оказывает антипролиферативное воздействие на клетки ER α -положительного рака молочной железы и демонстрирует высокую селективность. Антиэстрогенные эффекты THB5T-1 подтверждают его значительный потенциал как селективного ингибитора пути HSP90/ER α /GREB1 и блокатора ER α -опосредованной пролиферации опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак молочной железы, HSP90, рецептор эстрогенов α , антипролиферативный агент

Для цитирования: Щербаков А.М., Сорокин Д.В., Сальникова Д.И. и др. Влияние нового ингибитора HSP90 на сигнальные пути рецептора эстрогенов α в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):54–65.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-54-65>

Effects of a novel HSP90 inhibitor on estrogen receptor α signaling pathways in breast cancer cells

A.M. Scherbakov^{1,2}, D.V. Sorokin¹, D.I. Salnikova^{1,3}, M.V. Gudkova¹, O.E. Andreeva¹, A.L. Mikhaylova¹, N.A. Varabyeva⁴, Yu.A. Piven⁴

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

²G.F.Gauze Institute of New Antibiotics; 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., 119021 Moscow, Russia;

³N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences; 47 Leninsky Prospekt, 119991 Moscow, Russia;

⁴Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus; 5/2 Akademika Kuprevicha St., 220084 Minsk, Belarus

Contacts: Alexander Mikhailovich Scherbakov alex.scherbakov.2010@ya.ru

Introduction. Heat shock proteins (HSP), also known as molecular chaperones, are a large family of proteins that play crucial roles in histogenesis, homeostasis, and the folding and functional regulation of numerous client proteins. Among them, HSP90 is a key player, particularly in supporting the growth of tumor cells. HSP90 impacts multiple carcinogenic signaling pathways, including BCR-ABL, Raf-1, AKT, human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2/HER2), hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α), janus kinase 2 (JAK2), STAT3, p53, and estrogen receptor α (ER α). As a result, the search for new, selective inhibitors of this chaperone is a high priority in medicinal chemistry and oncology.

Aim. To evaluate the antiproliferative activity of a novel HSP90 inhibitor, THB5T-1, on ER α -positive breast cancer cell lines and assess its anti-estrogenic potential and selectivity.

Materials and methods. The study was conducted on hormone-dependent breast cancer cell lines MCF7 and T47D, along with the normal fibroblast line hFB-hTERT. The antiproliferative activity of THB5T-1 was measured using the MTT assay, while immunoblotting was employed to analyze the effects of HSP90 inhibition on cell signaling pathways. Anti-estrogenic activity was assessed in MCF7 cells via a reporter assay, and molecular modeling was used to construct a model of THB5T-1 interaction with the ligand-binding domain of ER α .

Results. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of THB5T-1 was determined to be 4.3 μ M for MCF7 cells and 5.6 μ M for T47D cells. At a concentration of 25 μ M, cell survival decreased to 20%. The selectivity index for THB5T-1 varied from 3.7 to 5.0 in different breast cancer cell lines. The compound's effects on hormonal pathways in MCF7 cells, as observed via reporter assay and immunoblotting, were dose-dependent. These findings were further supported by molecular docking studies, showing THB5T-1 interaction with the ligand-binding domain of ER α . Additionally, the antiproliferative activity of THB5T-1 in MCF7 cells was associated with reduced expression of cell cycle regulators cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). Significant efficacy of compound THB5T-1 in combination with a selective AKT inhibitor was revealed.

Conclusion. Compound THB5T-1 demonstrated significant antiproliferative effects on ER α -positive breast cancer cells and exhibited high selectivity. Its anti-estrogenic effects highlight its potential as a selective inhibitor of the HSP90/ER α /GREB1 pathway, effectively blocking ER α -mediated cell proliferation.

Keywords: breast cancer, HSP90, estrogen receptor α , antiproliferative agent

For citation: Scherbakov A.M., Sorokin D.V., Salnikova D.I. et al. Effect of a novel HSP90 inhibitor on estrogen receptor α signaling pathways in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):56–65. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-54-65>

ВВЕДЕНИЕ

Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) представляют собой большое семейство эволюционно консервативных белков с молекулярной массой от 8 до 150 кДа, обнаруживаемых в клетках всех живых организмов. Одной из наиболее часто встречающихся в клетках млекопитающих является изоформа HSP весом 90 кДа (HSP90) [1, 2]. Некоторые HSP экспрессируются конститутивно, в то время как другие активируются в ответ на клеточный стресс, играя ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза, пролиферации, выживания и дифференцировки [3].

HSP90 имеет 4 изоформы, присутствующие как в цитозоле (HSP90 α и HSP90 β), так и в специфических органеллах: TRAP1 – в митохондриях, GRP94 – в эндоплазматической сети. Результаты ряда исследований свидетельствуют о включении белков HSP в клеточные мембраны [4]. С помощью экзосом возможен

перенос HSP90 во внеклеточную среду [5]. В опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия этого шаперона, причем его конформация более чувствительна к селективным ингибиторам по сравнению с нормальными клетками. Кроме того, показано, что опухолевый супрессор p53 при возникновении мутаций индуцирует секрецию HSP90 α [6]. Этот механизм участвует в поддержании синтеза белков, важных для выживаемости опухолевых клеток.

HSP90 влияет на множество мишеней, включая BCR-ABL, Raf-1, AKT, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (ERBB2/HER2), индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α), янус-киназу 2 (JAK2), STAT3, p53 и стероидные рецепторы. Связывание или подавление экспрессии этого шаперона приводит не только к изменениям в самой сигнальной цепи шаперонов, но и к нарушению конформации и возможному протеолизу клиентских белков.

HSP90 необходим для димеризации рецепторов эстрогенов (ER) ER α / α и ER α / β , а также играет большую роль в эстрогензависимой транскрипционной активности гомодимера рецептора, регулируя ER-опосредованную пролиферацию клеток. Ингибирование HSP90 в опухолевых клетках с высокой экспрессией ER α приводит к быстрому уменьшению времени распада рецептора [7].

Вовлеченность HSP90 в разнообразные биологические процессы и влияние примерно на 400 клиентских белков сделали его перспективной мишенью для терапии различных заболеваний, включая онкологические. Однако точное прогнозирование воздействия ингибиторов HSP90 на нормальные клетки организма является сложной задачей, поскольку их фармакологическая активность также регулируется рядом ко-шаперонов [8].

С 1994 г., когда был описан первый ингибитор HSP90, количество подобных молекул значительно возросло, а их классификация расширилась [9–11]. Однако далеко не все такие агенты прошли проверку на селективность, таргетность механизма действия и безопасность [12]. Результаты клинических испытаний ряда агентов также показали множество нецелевых эффектов. С учетом развития лекарственной резистентности, низкой селективности и дозозамещающей токсичности сегодня монотерапия ингибиторами HSP90 в клинической практике не применяется. Тем не менее поиск новых ингибиторов шаперонов остается актуальной задачей медицинской химии и фармакологии.

Цель исследования – изучение антипролиферативной активности нового ингибитора HSP90 – TNB5T-1 – на линиях клеток ER α -положительного рака молочной железы (PMЖ) и оценка его антиэстрогенного потенциала и селективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и синтез ингибитора HSP90. Схема синтеза и характеристики TNB5T-1 описаны в работе N.A. Varabyeva и соавт. [13]. Реагенты для работы с клеточными линиями приобретены в компании «Пан-Эко» (Россия), первичные антитела – в Cell Signaling Technology (США), сыворотка – в HyClone (США). Липофектамин 2000 предоставлен Thermo Fisher Scientific (США).

Линии клеток и культивирование. Клетки гормонозависимого PMЖ человека линий MCF7 и T47D получены из American Type Culture Collection (США) и до проведения экспериментов хранились в биобанке Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Идентичность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (Gordiz, Россия). Фибробласты hFB-hTERT и протокол для работы с ними предоставлены Э.Б. Дашинамаевым и В.В. Татарским [14].

Клетки MCF7 и hFB-hTERT культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), T47D – в среде RPMI-1640. Среда для культур клеток содержала 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллин (50 Ед/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). В среду RPMI-1640 добавляли смесь витаминов для культур клеток («ПанЭко», Россия). Инкубацию проводили при температуре 37 °С в 5 % CO₂ при относительной влажности 85–90 %. В экспериментах использовали культуры на логарифмической стадии роста.

Оценка антипролиферативной активности соединений. Этот показатель определяли с помощью МТТ-теста, основанного на восстановлении жизнеспособными клетками 3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолбромидом [15]. Тест проводили с модификациями, описанными ранее в работе [16]. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) вычисляли в GraphPad Prism методами нелинейной регрессии.

Оценка ER α -зависимой трансактивации гена-репортера. Для определения транскрипционной активности ER α клетки линии MCF7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем эстроген-чувствительных элементов. Плазмида ERE-TK-LUC предоставлена G. Reid и F. Gannon [17]. Для трансфекции использовали Липофектамин 2000. Эффективность и потенциальную токсичность трансфекции контролировали с помощью котрансфекции клеток плазмидой, содержащей ген β -галактозидазы, под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV-beta-gal). Определение активности люциферазы проводили на планшетном люминометре TECAN Infinite M200Pro согласно рекомендациям производителя набора реагентов (Promega, США). Уровень β -галактозидазы определяли по стандартному протоколу [18] на планшетном спектрофотометре MultiSkan FC (Thermo Fisher Scientific, США). ER α -зависимую трансактивацию выражали в условных единицах как отношение активности люциферазы к активности β -галактозидазы. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; каждый эксперимент воспроизводили не менее 3 раз. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ DATAPLOT и GraphPad Prism.

Иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга клетки MCF7 на стадии 70 % монослоя лизировали в буфере следующего состава: 50 мМ Трис-НСl pH 7,4; 1 % Igepal CA-630; 150 мМ NaCl; 1 мМ этилендиаминтетраацетата; 1 мМ дитиотреитола; 1 мкг/мл аprotинина; 1 мкг/мл леупептина; 1 мкг/мл пепстатина; 1 мМ фторида натрия; 1 мМ ортованадата натрия. Образцы инкубировали на льду 20 мин, затем центрифугировали (8000g, 10 мин, при температуре 4 °С), проводили электрофорез в 10 % полиакриламидном геле, а также перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Protran и иммуноблоттинг.

Содержание ER α , GREB1, p53, циклина D1, циклинзависимой киназы 4 (CDK4), p-AKT, AKT, HSP60, HSP40, кальнексина и протеиндисульфидизомеразы (PDI) в полученных образцах определяли с помощью антител Cell Signaling Technology (США). Детекцию выполняли со вторичными антителами к иммуноглобулину кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США), в системе для анализа ImageQuant LAS 4000 (GE HealthCare, США).

Молекулярный докинг. Молекулы обоих энантиомеров соединения THB5T-1 и 4-гидрокситамоксифена (4-ОНТ) подготовлены в программе DataWarrior [19] с использованием силового поля MMFF94S+. Полученные sdf-файлы последовательно конвертированы в mol2-файлы с помощью OpenBabel [20] и далее в pdbqt-файлы с использованием скрипта prepare_ligand4.py из программного пакета AutoDockTools [21]. Для подготовки рецептора из комплекса лигандсвязывающего домена ER α с 4-ОНТ (PDB ID 3ERT) в программе Discovery Studio Visualizer удаляли лиганд и воду, недостающие атомы реконструировали с помощью Swiss-PdbViewer и полученный pdb-файл конвертировали в pdbqt-файл в AutoDockTools. Установлены следующие параметры кармана для докинга: $\Delta X=18 \text{ \AA}$, $\Delta Y=\Delta Z=14 \text{ \AA}$ с центром в $X = 31 \text{ \AA}$, $Y = -3 \text{ \AA}$, $Z = 25 \text{ \AA}$. Докинг осуществляли с использованием QVina2 [22]. Визуализацию результатов докинга выполняли с помощью PyMol и Discovery Studio Visualizer.

Симуляции молекулярной динамики и расчеты MM/GBSA. Симуляции молекулярной динамики, полученные в результате докинга комплексов или экспериментального комплекса 4-ОНТ с ER α , выполняли с использованием GROMACS [23] и силового поля AMBER99SB-ILDN. Лиганды параметризовали с помощью ACPYPE [24] (силовое поле GAFF и заряды BCC). Комплексы помещали в додекаэдрический бокс и растворяли в воде (TIP3P). В системы добавляли ионы Na $^+$, чтобы сделать их электрически нейтральными. Минимизацию энергии проводили с использованием алгоритма градиентного спуска. Системы уравнивали в ансамбле NVT (1 нс), за которым следовало уравнивание в ансамбле NPT (1 нс) с ограничениями, приложенными ко всем атомам, кроме атомов водорода. Затем все ограничения снимали и проводили симуляцию 200 нс в ансамбле NPT при температуре 300 °К и давлении 1 бар.

Изменение энтальпии (ΔH), энтропийный фактор ($T\Delta S$) и изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) рассчитаны на основе полученных из симуляций траекторий с использованием программного обеспечения gmx_MMPBSA [25]. MM/GBSA ΔH рассчитывался с помощью однотомакторного подхода и модели GB-HCT [26] на основе 15 000 последних кадров (начиная с 50 нс). Терм $T\Delta S$ рассчитывали с использованием метода нормальных колебаний (normal-mode entropy) на основе 11 кадров (начиная с кадра 15 000, интервал – 1500).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка антипролиферативной активности и селективности ингибитора HSP90 THB5T-1. Ранее нами были описаны новые ингибиторы HSP90 на основе 5-триазолил-замещенных 4,5,6,7-тетрагидробензо[*d*]-изоксазолов и 6,7-дигидробензо[*d*]изоксазол-4(5*H*)-онов [13]. Исследование их антипролиферативных свойств выполнено на клетках РМЖ MCF7 и HCC1954. Среди синтезированных веществ наибольшую активность в отношении HER2-положительного РМЖ HCC1954 проявило соединение THB5T-1 ($IC_{50} < 5 \text{ мкМ}$) (рис. 1, а, табл. 1).

Антипролиферативную активность THB5T-1 на клетках ER α -положительного РМЖ линий MCF7 и T47D оценивали в диапазоне концентраций от 3,1 до 50 мкМ посредством МТТ-теста. Соединение THB5T-1 в концентрации 3,1 мкМ вызывало снижение выживаемости клеток на 20–30 %. Значения IC_{50} составили 4,3 мкМ для линии MCF7 и 5,6 мкМ для линии T47D, что говорит о схожей чувствительности клеток к соединению. Увеличение концентрации THB5T-1 до 25 мкМ приводило к практически полному подавлению роста клеток РМЖ; их выживаемость составила около 20 % (рис. 1, б).

Оценка селективности антипролиферативных агентов является важным этапом доклинических исследований [27]. В таких экспериментах используют линии нормальных клеток, способных к пролиферации в условиях *in vitro*. Токсичность соединения на нормальных клетках оценивают в том же тесте, что и для линии малигнизированных клеток, и затем проводят сравнение выявленных эффектов. В наших экспериментах фибробласты hFB-hTERT инкубировали с соединением THB5T-1 для оценки его потенциальной токсичности. Кривая роста hFB-hTERT проходит выше, чем кривые роста, полученные для линий РМЖ (см. на рис. 1, б). Установлено, что IC_{50} на линии hFB-hTERT для соединения THB5T-1 составляет $>20 \text{ мкМ}$. Селективность оценивалась как отношение значений IC_{50} для hFB-hTERT к значениям для опухолевых клеток. Индексы селективности указаны в табл. 1. Они варьировали от 3,7 до 5, опережая аналогичные показатели для известных химиопрепаратов, описанные ранее [28–30]. Так, в нашей недавней работе [28] показано, что доксорубин проявляет высокую активность в отношении как злокачественных клеток, так и нормального эпителия. Обнаруженные эффекты данного препарата подчеркивают необходимость дальнейших разработок химиотерапевтических средств с низкой токсичностью и высокой селективностью. Таким образом, соединение THB5T-1 оказывает значительное антипролиферативное влияние на клетки РМЖ и демонстрирует высокую селективность воздействия.

Влияние ингибитора HSP90 THB5T-1 на сигнальные пути клеток гормонозависимого рака MCF7. Эксперименты следующего этапа были нацелены на опреде-

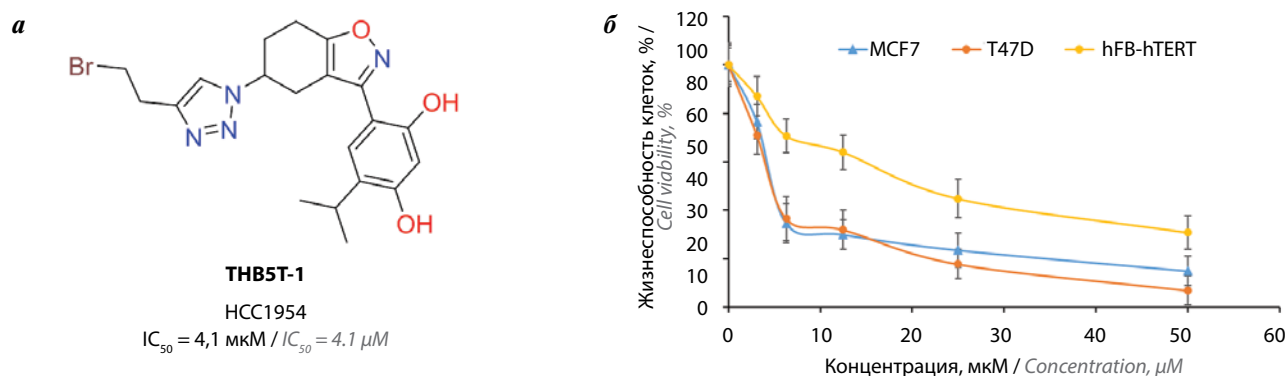


Рис. 1. Структура (а) и антипролиферативная активность THB5T-1 в отношении клеток гормонозависимого рака молочной железы и фибробластов. Синтез THB5T-1 описан в [13]. Оценка выживаемости клеток ERα-положительного (ERα – рецептор эстрогенов α) рака молочной железы MCF7 и T47D и фибробластов hFB-hTERT после инкубации с THB5T-1 в течение 72 ч; результаты MTT-теста (б). IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования

Fig. 1. Structure (a) and antiproliferative activity of THB5T-1 against hormone-dependent breast cancer cells and fibroblasts. The synthesis of THB5T-1 has been previously described in reference [13]. The survival of ERα-positive (ERα – estrogen receptor α) breast cancer cell lines MCF7 and T47D, as well as hFB-hTERT fibroblasts, was assessed after a 72-hour incubation with THB5T-1; the results of the MTT assay (b). IC_{50} – half-maximal inhibitory concentration

Таблица 1. Антипролиферативная активность и селективность THB5T-1

Table 1. Antiproliferative activity and selectivity of THB5T-1

Линия клеток Cell line	Значение IC_{50} , (среднее значение ± стандартное отклонение), мкМ IC_{50} values (mean ± standard deviation), μM	Индекс селективности, у.е. Selectivity index, r.u.
MCF7	$4,3 \pm 0,7$ *	4,8
T47D	$5,6 \pm 0,8$	3,7
HCC1954	$4,1 \pm 0,7$ *	5,0
hFB-hTERT	$20,6 \pm 1,5$	–

*Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) получено в работе [13].

*The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was obtained in [13].

ление изменений сигналинга клеток MCF7 после инкубации с соединением THB5T-1. Клетки MCF7 инкубировали с THB5T-1 в течение 24 ч, затем обрабатывали лизирующим буфером и использовали для приготовления образцов и проведения белкового электрофореза. Уровень экспрессии сигнальных белков в полученных образцах определяли методом иммуноблоттинга. Известно, что фармакологическое воздействие на HSP90 приводит к перестройке всей сигнальной цепи шаперонов. Результаты исследования K. Tokui и соавт. показали, что ингибитор HSP90 17-DMAG значительно усиливает экспрессию шаперонов HSP70 и HSP40 в клетках SH-SY5Y [31]. Результаты анализа белков, описанные в нашей предыдущей работе, также свидетельствуют об увеличении экспрессии HSP70 в клетках РМЖ HCC1954 после их обработки синтезированным соединением THB5T-1 [13]. Рост экспрессии HSP70 является одним из фармакологических маркеров ингибирования пути HSP90 [32, 33], что подтверждает селективность нового ингибитора HSP90.

В настоящей работе первая группа исследованных белков включала HSP60, HSP40, кальнексин и PDI. GAPDH был использован в качестве контроля загрузки проб в гель. Согласно данным, представленным на рис. 2, соединение THB5T-1 не влияло на экспрессию HSP60. Незначительное снижение экспрессии HSP40 определено в клетках MCF7 после инкубации с высокой дозой THB5T-1 (5 мкМ). Кальнексин – шаперон, регулирующий фолдинг белков и участвующий в контроле их качества [34], он специфически взаимодействует с N-связанными олигосахаридами, содержащими один остаток глюкозы, удерживая их в развернутом или несобранном виде в эндоплазматическом ретикулуме. Согласно данным иммуноблоттинга кальнексин не был вовлечен в ответ клеток MCF7 на ингибитор HSP90 THB5T-1. Также не обнаружено изменений экспрессии еще одного фермента эндоплазматического ретикулума – PDI [35]. Таким образом, не выявлено значительных перестроек в сигнальных путях исследованных шаперонов, за исклю-

чением HSP70, рассмотренного в нашей более ранней работе [13].

Вторая группа проанализированных белков, связанных с HSP90, относилась к гормональным путям клеток РМЖ. Молекулярная ось, соединяющая HSP90 с рецепторами стероидных гормонов, детально описана в литературе [36]. Неактивный рецептор стероидных гормонов находится в цитозоле в комплексе с HSP90. Взаимодействие рецепторов со своими физиологическими лигандами, к которым относятся дигидротестостерон, 17β -эстрадиол и другие стероиды, приводит к их многоступенчатой активации, происходящей с непосредственным участием ряда шаперонов. Мы обнаружили дозозависимое воздействие соединения THB5T-1 на экспрессию ER α , который является ключевым драйвером роста клеток MCF7 (см. рис. 2). Соединение THB5T-1 в дозах 2,5 и 5 мкМ практически полностью блокировало экспрессию этого рецептора. Оценка функциональной активности ER α возможна с применением анализа экспрессии генов, содержащих эстроген-чувствительные элементы [37]. Экспрессия таких генов повышается при инкубации клеток с гормоном (эстрогеном) и, напротив,

снижается при обработке клеток антиэстрогенами. Выявленный высокий базальный уровень экспрессии GREB1 косвенно подтверждает высокую активность ER α в клетках MCF7. Антиэстрогенные эффекты соединения THB5T-1, обнаруженные по снижению экспрессии GREB1 в концентрациях 0,63 мкМ и выше, доказывают его значительный потенциал как селективного ингибитора пути HSP90/ER α /GREB1.

В третью группу, представленную на рис. 2, вошли белки, участвующие в регуляции пролиферации и выживаемости опухолевых клеток. Инкубация клеток с соединением THB5T-1 не приводила к изменению экспрессии p53 – основного опухолевого супрессора. Клетки млекопитающих экспрессируют 3 циклина D (D1, D2 и D3), которые координированно функционируют как регуляторы CDK4/CDK6 при переходе клеточного цикла из фазы G1 в фазу S [38]. Действие широкого ряда химиотерапевтических агентов на опухолевые клетки реализуется через направленное снижение экспрессии циклинов D и активности CDK. Например, U. De и соавт. обнаружили значительное снижение экспрессии циклина D1 в клетках РМЖ MCF7 после их инкубации с доксорубицином [39].

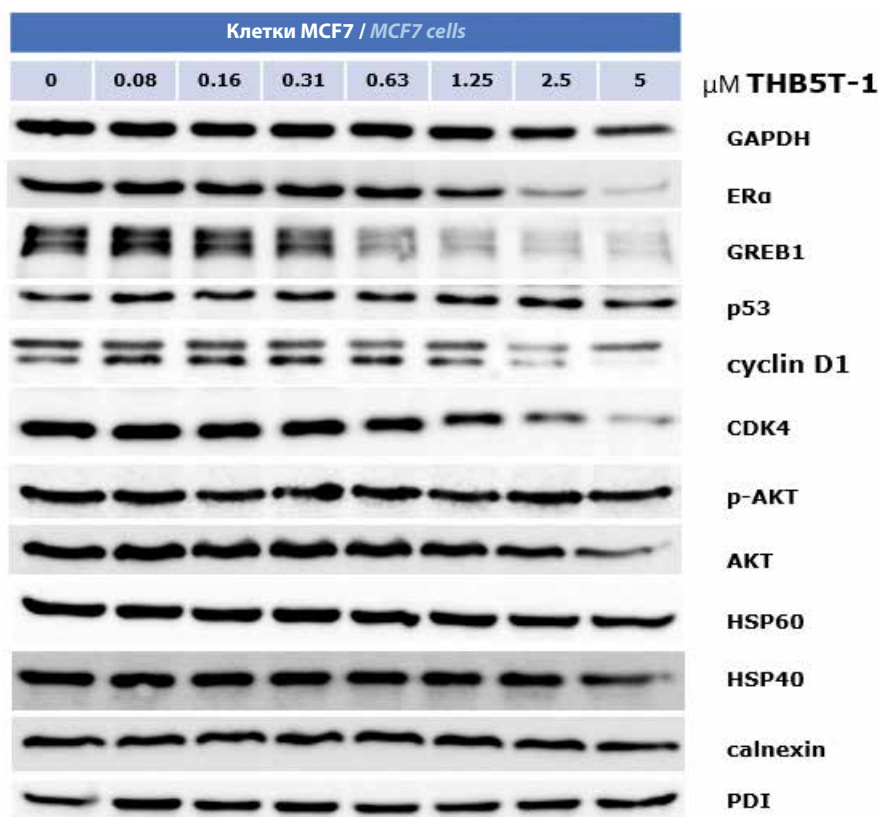


Рис. 2. Регуляция сигнальных путей клеток ER α -положительного (ER α – рецептор эстрогенов α) рака молочной железы MCF7 ингибитором HSP90 THB5T-1. Клетки MCF7 рассеивали по 800 тыс. на чашки Петри (диаметр – 100 мм) и через 24 ч обрабатывали ингибитором HSP90 THB5T-1 в указанной концентрации, через 12 ч повторно проводили обработку клеток ингибитором. Образцы для иммуноблоттинга готовили через 12 ч после повторной обработки клеток соединением

Fig. 2. Regulation of signaling pathways in ER α -positive (ER α – estrogen receptor α) MCF7 breast cancer cells by the HSP90 inhibitor THB5T-1. MCF7 cells were seeded at a density of 800,000 cells per 100 mm Petri dish and treated with the HSP90 inhibitor THB5T-1 at the specified concentration 24 h post-plating. After 12 h, the cells were subjected to a second treatment with the inhibitor. Samples for immunoblot analysis were collected 12 h after the second treatment

Согласно данным, представленным на рис. 2, соединение THB5T-1 также вызывает изменение экспрессии циклина D1. В клетках MCF7, обработанных THB5T-1 в дозах 2,5 и 5 мкМ, обнаружено существенное снижение этого показателя. Митотические сигналы вызывают связывание циклина D1 с киназой CDK4, являющейся его ключевым эффектором. Инкубация клеток с THB5T-1 приводила к значительному снижению экспрессии CDK4. Киназа АКТ относится к сигнальным путям, поддерживающим выживаемость опухолевых клеток и их устойчивость к повреждающим воздействиям. В клетках MCF7, как правило, определяется высокий уровень активности АКТ, соединение THB5T-1 не вызывало значительного уменьшения ее активности.

Анализ антиэстрогенной активности соединения THB5T-1. Анализ антиэстрогенной активности THB5T-1 проводили в клетках MCF7 после трансфекции плазмидами, содержащими ген люциферазы под контролем эстроген-чувствительных элементов. 17 β -эстрадиол – физиологический лиганд ER α – использовали для индукции активности люциферазы в клетках MCF7/ERE-LUC. Согласно данным, представленным на рис. 3, в клетках, обработанных 17 β -эстрадиолом, выявлен существенный рост активности люциферазы. Ингибитор HSP90 THB5T-1 вызывал дозозависимое снижение этого показателя. Таким образом, данные репортерного анализа подтверждают результаты иммуноблоттинга, свидетельствующие об антиэстрогенной активности ингибитора HSP90 THB5T-1.

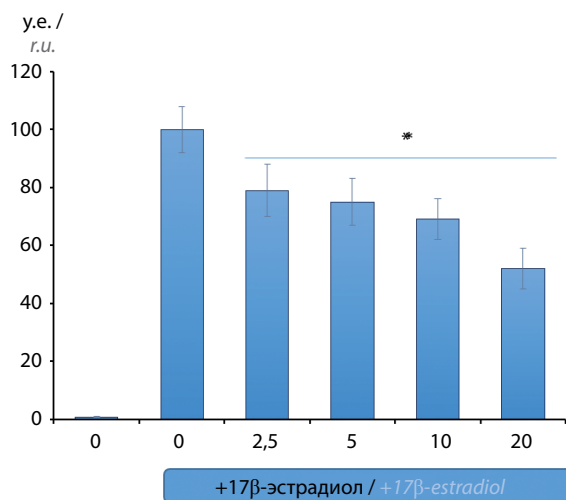


Рис. 3. Активность люциферазы в клетках MCF7/ERE-LUC. Клетки инкубировали с физиологическим лигандом рецептора эстрогенов α 17 β -эстрадиолом (10 нМ) и ингибитором HSP90 THB5T-1 в указанных концентрациях. Антиэстрогенный потенциал THB5T-1 оценивали как уровень ингибирования индуцированной активности люциферазы. * $p < 0,05$ при сравнении с клетками, обработанными только 17 β -эстрадиолом

Fig. 3. Luciferase activity in MCF7/ERE-LUC cells. The cells were incubated with the physiological estrogen receptor α ligand, 17 β -estradiol (10 nM), and the HSP90 inhibitor, THB5T-1, at the specified concentrations. The anti-estrogenic potential of THB5T-1 was assessed by measuring the degree of inhibition of luciferase activity induced by * $p < 0.05$ compared to cells treated with 17 β -estradiol alone)

Оценка сродства соединения THB5T-1 к ER α методами молекулярного моделирования. Для проверки того, может ли антиэстрогенная активность THB5T-1, описанная в предыдущих разделах, быть обусловлена не только ингибированием HSP90, но и прямым связыванием с ER α , мы провели молекулярный докинг, поместив THB5T-1 в сайт связывания лигандов ER α и последующие симуляции молекулярной динамики с расчетом значений ΔG методом MM/GBSA. В качестве рабочей структуры использован комплекс лиганд-связывающего домена ER α с 4-ОНТ (PDB ID 3ERT). Соединение THB5T-1 является рацематом, поэтому молекулярное моделирование осуществлено для обоих энантиомеров.

На рис. 4 представлены теоретические модели взаимодействия (*R*)-THB5T-1 (3D – см. рис. 4, а, 2D – см. рис. 4, б) и (*S*)-THB5T-1 (3D – см. рис. 4, в, 2D – см. рис. 4, г) с ER α , полученные в результате докинга. Также для сравнения приведена экспериментальная модель взаимодействия 4-ОНТ с ER α (3D – см. рис. 4, д, 2D – см. рис. 4, е). Скоринг-функцией Vina для (*R*)-THB5T-1 присвоено значение аффинности, равное $-7,4$ ккал/моль, а для (*S*)-THB5T-1 – $-7,7$ ккал/моль. Для 4-ОНТ данный показатель составил $-9,7$ ккал/моль в случае позы, практически идентичной экспериментальной.

Используемые в докинг-программах скоринг-функции позволяют лишь приблизительно оценить сродство малой молекулы к белку. Для более точного прогноза существует ряд методов, основанных на симуляциях молекулярной динамики, полученных в результате докинга комплексов. Ранее мы выявили хорошую сходимость прогноза с экспериментальными результатами при расчете значений ΔG образования межмолекулярных комплексов на основе длительных (200 нс) симуляций молекулярной динамики с использованием метода MM/GBSA и явным учетом энтропии [40]. Этот же подход использован для предсказания ΔG образования комплексов ER α с обеими энантиомерами THB5T-1 и сравнения ER α с 4-ОНТ. Полученные данные представлены в табл. 2.

Особенностью метода MM/GBSA является то, что расчетные значения ΔH в абсолютном выражении оказываются выше экспериментальных. Однако на основе полученных цифр можно ранжировать сродство различных малых молекул к белку. Согласно полученным данным, если оценивать аффинность обоих энантиомеров THB5T-1 к ER α только по ΔH , то она незначительно уступает таковой у 4-ОНТ. Если же учесть энтропийный вклад, то аффинность (*R*)-THB5T-1 оказывается даже чуть выше, чем у 4-ОНТ.

Разработка синергетических комбинаций THB5T-1. Активное развитие фармакотерапии во второй половине XX века привело к внедрению в практику ряда препаратов на основе гетероциклических соединений. Большинство одобренных лекарственных средств нацелены на клетки с высокой скоростью пролиферации,

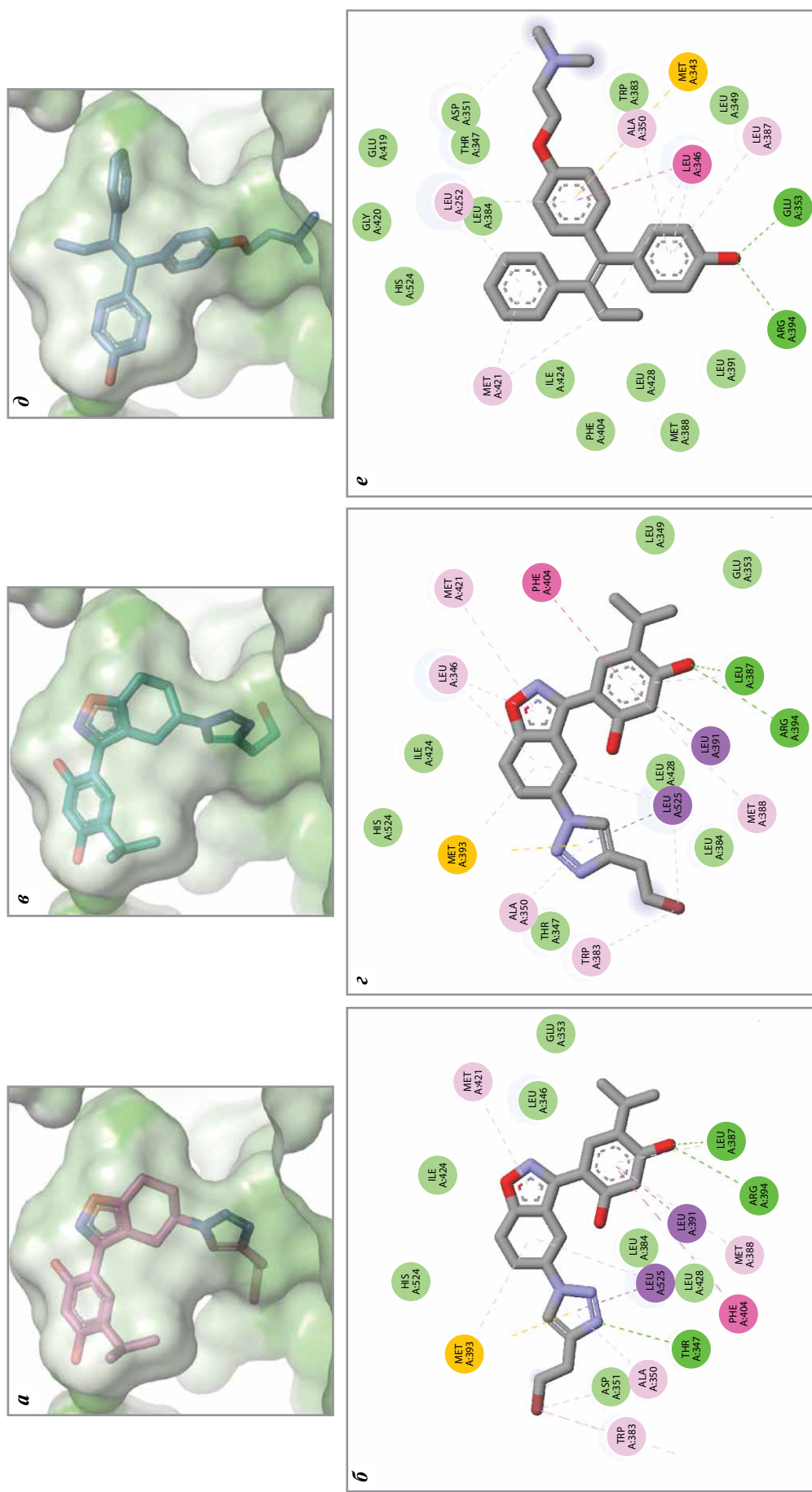


Рис. 4. Теоретические модели взаимодействия соединений (R)-THB5T-1 (3D – a, 2D – б) и (S)-THB5T-1 с лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогенов α (ERα) (3D – в, 2D – г) и экспериментальная модель взаимодействия 4-OHT с лигандсвязывающим доменом ERα (3D – д, 2D – е)
Fig. 4. Theoretical models for the interaction of compounds (R)-THB5T-1 (3D – a, 2D – б) and (S)-THB5T-1 (3D – в, 2D – г) with the ligand-binding domain of ERα (ERα) and an experimental model for the interaction of 4-OHT with the ligand-binding domain of ERα (3D – д, 2D – е)

Таблица 2. Значения ΔH , $T\Delta S$ и ΔG образования комплексов (R)-ТНВ5Т-1, (S)-ТНВ5Т-1 и 4-ОНТ с лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогенов α , полученные с помощью метода ММ/ГБСА

Table 2. Values of ΔH , $T\Delta S$ and ΔG of the formation of complexes of (R)-ТНВ5Т-1, (S)-ТНВ5Т-1 and 4-ОНТ with the ligand-binding domain of estrogen receptor α obtained by the MM/GBSA method

Соединение Compound	ΔH , ккал/моль ΔH , kcal/mol	$T\Delta S$, ккал/моль $T\Delta S$, kcal/mol	ΔG , ккал/моль ΔG , kcal/mol
(R)-ТНВ5Т-1	-46,26	-22,84	-23,42
(S)-ТНВ5Т-1	-46,48	-24,75	-21,73
4-ОНТ	-47,20	-24,12	-23,08

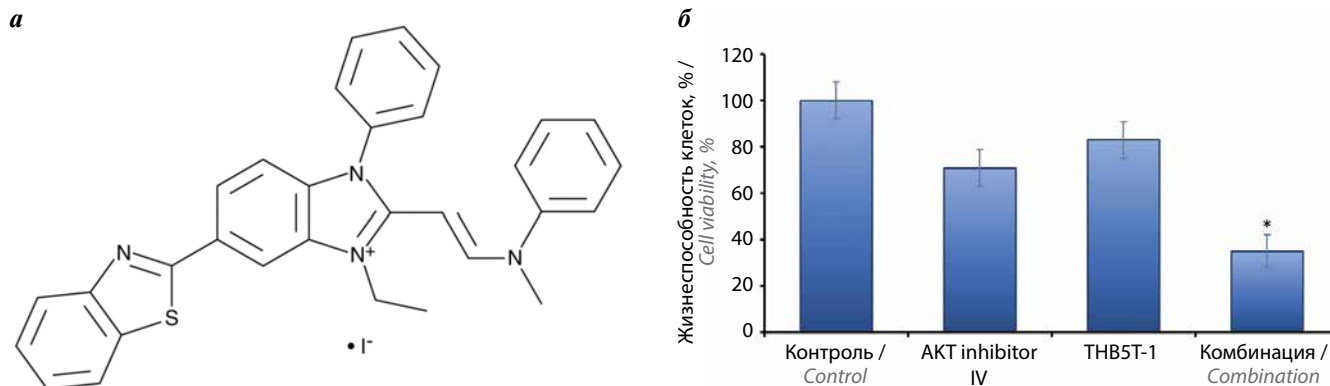


Рис. 5. Анализ воздействия комбинации ТНВ5Т-1 с ингибитором АКТ на выживаемость клеток MCF7: а – химическая структура АКТ inhibitor IV (АКТ-IV); б – результаты МТТ-теста, проведенного после инкубации клеток MCF7 с 1,7 мкМ ТНВ5Т-1; 0,1 мкМ АКТ-IV или с их комбинацией. * $p < 0,05$ при сравнении с контрольными клетками и клетками, обработанными одним из соединений (ингибитором АКТ или ТНВ5Т-1)

Fig. 5. Analysis of the effects of the THB5T-1 combination with the AKT inhibitor on the survival of MCF7 cells: a – the chemical structure of AKT Inhibitor IV (AKT-IV); b – the results of the MTT assay, conducted after incubating MCF7 cells with 1.7 μM THB5T-1, 0.1 μM AKT-IV, or their combination, are presented. * $p < 0.05$ compared to control cells and cells treated with either of the compounds (AKT inhibitor or THB5T-1)

что, в свою очередь, определяет широкий спектр нежелательных явлений терапии, в частности, значительные повреждения слизистых оболочек органов [41, 42]. Одним из возможных подходов к снижению таких токсических эффектов является поиск синергетических комбинаций препаратов, обеспечивающих уменьшение доз [43]. Как указано выше, соединение ТНВ5Т-1 не оказывало влияния на активность киназы АКТ в клетках MCF7, на основе чего начата разработка его комбинаций с селективным ингибитором АКТ. Среди доступных малых молекул мы выбрали АКТ inhibitor IV (АКТ-IV) [44] с высокой активностью как на клетках MCF7, так и на полученных из них клетках, резистентных к тамоксифену [45]. Клетки MCF7 инкубировали с ТНВ5Т-1, АКТ-IV или их комбинацией в течение 72 ч и затем оценивали выживаемость с помощью МТТ-теста (рис. 5). Обнаруженные эффекты каждого из соединений были незначительными: выживаемость клеток снизилась на 20–30 %. Анализ воздействия комбинации ТНВ5Т-1 с АКТ-IV на клетки MCF7 выявил синергию.

Моделирование сигнальных путей $\text{ER}\alpha$, выполненное в базе STRING (рис. 6), иллюстрирует его значительные связи с HSP90 и другими белками-регуляторами

пролиферации и выживаемости опухолевых клеток. Одновременное ингибирование двух молекулярных узлов этой сети – $\text{ER}\alpha$ и HSP90, обнаруженное при воздействии ТНВ5Т-1 на опухолевые клетки, является перспективным подходом в разработке антипролиферативных средств.

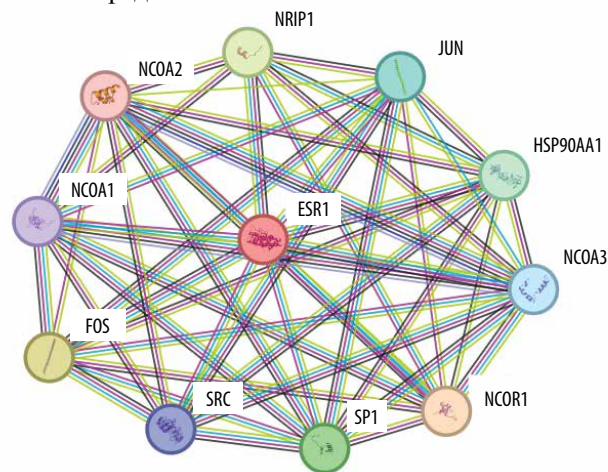


Рис. 6. Сигнальные пути рецептора эстрогенов α (схема построена в базе STRING: <https://string-db.org/>); ген ESR1 кодирует $\text{ER}\alpha$
Fig. 6. The estrogen receptor α signaling pathways (the scheme is designed in STRING: base <https://string-db.org/>); ESR1 gene encodes $\text{ER}\alpha$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получены данные о влиянии ингибитора HSP90 THB5T-1 на сигнальные пути и выживаемость клеток РМЖ. Соединение THB5T-1 относится к группе ранее синтезированных 5-триазолил-замещенных 4,5,6,7-тетрагидробензо[*d*]-изоксазолов, описанных в [13]. Ингибитор подавлял рост опухолевых клеток при низких микромолярных концентрациях, а также демонстрировал высокую селективность действия, как было показано в исследовании на нормальных фибробластах линии hFB-hTERT. Методами молекулярного докинга, репортерного анализа и иммуноблоттинга выявлены антиэстрогенные эффекты соединения THB5T-1, которые доказывают его значительный потенциал как селективного ингибитора пути HSP90/ER α /GREB1 и блокатора ER α -опосредованной пролиферации (см. рис. 6).

Следует отметить, что воздействие исследуемого соединения на опухолевые клетки не приводило

к изменению экспрессии p53, однако способствовало значительному снижению экспрессии киназы CDK4, которая играет ключевую роль в прохождении клеточного цикла через фазу G1. Кроме того, не было выявлено значительных изменений в сигнальных путях шаперонов, за исключением шаперона 70, подробно исследованного ранее в работе N.A. Varabyeva и соавт. [13]. Активность киназы АКТ также оставалась без изменений в клетках MCF7, обработанных THB5T-1. Обнаруженные эффекты послужили основанием для разработки синергетических комбинаций THB5T-1 с ингибитором АКТ-IV. Выявлена высокая эффективность комбинации соединений в отношении клеток гормонозависимого РМЖ линии MCF7.

Таким образом, ингибитор HSP90/ER α THB5T-1 является перспективным кандидатом для дальнейшего изучения и может стать важным компонентом в комбинированной терапии РМЖ или применяться в монотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Zagouri F., Bournakis E., Koutsoukos K. et al. Heat shock protein 90 (hsp90) expression and breast cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 2012;5(9):1008–20. DOI: 10.3390/ph5091008
- Birbo B., Madu E.E., Madu C.O. et al. Role of HSP90 in cancer. *Int J Mol Sci* 2021;22(19):10317. DOI: 10.3390/ijms221910317
- Whitley D., Goldberg S.P., Jordan W.D. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999;29(4):748–51. DOI: 10.1016/s0741-5214(99)70329-0
- Schwab M., Multhoff G. A Low membrane Hsp70 expression in tumor cells with impaired lactate metabolism mediates radiosensitization by NVP-AUY922. *Front Oncol* 2022;12:861266. DOI: 10.3389/fonc.2022.861266
- Li W., Tsen F., Sahu D. et al. Extracellular Hsp90 (eHsp90) as the actual target in clinical trials: intentionally or unintentionally. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;303:203–35. DOI: 10.1016/b978-0-12-407697-6.00005-2
- Zhang S., Wang C., Ma B. et al. Mutant p53 drives cancer metastasis via RCP-mediated Hsp90 α secretion. *Cell Rep* 2020;32(1):107879. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107879
- Gougelet A., Bouclier C., Marsaud V. et al. Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94(1–3):71–81. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2005.01.018
- Prodromou C. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J* 2016;473(16):2439–52. DOI: 10.1042/bcj20160005
- Piven Y.A., Yastrebova M.A., Khamidullina A.I. et al. Novel O-acylated (E)-3-aryl-6,7-dihydrobenzisoxazol-4(5H)-one oximes targeting HSP90-HER2 axis in breast cancer cells. *Bioorgan Med Chem* 2022;53:116521. DOI: 10.1016/j.bmc.2021.116521
- Neckers L. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 2002;8(4 Suppl.):S55–61. DOI: 10.1016/s1471-4914(02)02316-x
- Piven Yu.A., Scherbakov A.M., Yastrebova M.A. et al. Effective synthesis of novel dihydrobenzisoxazoles bearing the 2-aminothiazole moiety and evaluation of the antiproliferative activity of their acylated derivatives. *Org Biomol Chem* 2021;19(47):10432–43. DOI: 10.1039/d1ob01614h
- Pillai R.N., Ramalingam S.S. Throwing more cold water on heat shock protein 90 inhibitors in NSCLC. *J Thorac Oncol* 2018;13(4):473–4. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.02.010
- Varabyeva N.A., Salnikova D.I., Krymov S.K. et al. Design and synthesis of novel 6,7-dihydrobenzo[d]isoxazol-4(5H)-one derivatives bearing 1,2,3-triazole moiety as potential Hsp90 inhibitors and their evaluation as antiproliferative agents. *Chem Select* 2024;9(12):e202304812. DOI: 10.1002/slct.202304812
- Egorov E.E., Moldaver M.V., Vishniakova Kh.S. et al. Enhanced control of proliferation in telomerized cells. *Ontogenez* 2007;38(2):105–19.
- Iselt M., Holtei W., Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid *in vitro* assessment of cytotoxicity. *Arzneimittelforschung* 1989;39(7):747–9.
- Ilovaisky A.I., Scherbakov A.M., Chernoburova E.I. et al. Secosteroid diacylhydrazines as novel effective agents against hormone-dependent breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2024;244:106597. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2024.106597
- Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00090-x
- Scherbakov A.M., Komkov A.V., Komendantova A.S. et al. Steroidal pyrimidines and dihydrotriazines as novel classes of anticancer agents against hormone-dependent breast cancer cells. *Front Pharmacol* 2017;8:979. DOI: 10.3389/fphar.2017.00979
- Sander T., Freyss J., von Korff M. et al. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J Chem Inf Model* 2015;55(2):460–73. DOI: 10.1021/ci500588j
- O'Boyle N.M., Banck M., James C.A. et al. Open babel: an open chemical toolbox. *J Cheminform* 2011;3:33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30(16):2785–91. DOI: 10.1002/jcc.21256
- Alhossary A., Handoko S.D., Mu Y. et al. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. *Bioinformatics* 2015;31(13):2214–6. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv082

23. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015;1–2: 19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001
24. Sousa da Silva A.W., Vranken W.F. ACPYPE – AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res Notes* 2012;5:367. DOI: 10.1186/1756-0500-5-367
25. Valdes-Tresanco M.S., Valdes-Tresanco M.E., Valiente P.A. et al. gmx_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS. *J Chem Theory Comput* 2021;17(10):6281–91. DOI: 10.1021/acs.jctc.1c00645
26. Hawkins G.D., Cramer C.J., Truhlar D.G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. *J Physical Chem* 1996;100(51):19824–39. DOI: 10.1021/jp961710n
27. El-Naggar M., Eldehna W.M., Almahli H. et al. Novel thiazolidinone/thiazolo[3,2-a]benzimidazolone-Isatin conjugates as apoptotic anti-proliferative agents towards breast cancer: one-pot synthesis and *in vitro* biological evaluation. *Molecules (Basel)* 2018;23(6):1420. DOI: 10.3390/molecules23061420
28. Illovaisky A.I., Scherbakov A.M., Merkulova V.M. et al. Secosteroid-quinoline hybrids as new anticancer agents. *J Steroid Biochem molecular Biol* 2023;228:106245. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2022.106245
29. Supasena W., Muangnoi C., Praengam K. et al. Enhanced selective cytotoxicity of doxorubicin to breast cancer cells by methoxypolyethylene glycol conjugation via a novel beta-thiopropamide linker. *Eur Polymer J* 2020;141:110056. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110056
30. Duarte D., Nunes M., Ricardo S. et al. Combination of antimalarial and CNS drugs with antineoplastic agents in MCF-7 breast and HT-29 colon cancer cells: biosafety evaluation and mechanism of action. *Biomolecules* 2022;12(10):1490. DOI: 10.3390/biom12101490
31. Tokui K., Adachi H., Waza M. et al. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet* 2009;18(5):898–910. DOI: 10.1093/hmg/ddn419
32. Kudryavtsev V.A., Khokhlova A.V., Mosina V.A. et al. Induction of Hsp70 in tumor cells treated with inhibitors of the Hsp90 activity: a predictive marker and promising target for radiosensitization. *PLoS One* 2017;12(3):e0173640. DOI: 10.1371/journal.pone.0173640
33. Shimomura A., Yamamoto N., Kondo S. et al. First-in-Human phase I study of an oral HSP90 inhibitor, TAS-116, in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2019;18(3):531–40. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-18-0831
34. Ryan D., Carberry S., Murphy Á.C. et al. Calnexin, an ER stress-induced protein, is a prognostic marker and potential therapeutic target in colorectal cancer. *J Transl Med* 2016;14(1):196. DOI: 10.1186/s12967-016-0948-z
35. Powell L.E., Foster P.A. Protein disulphide isomerase inhibition as a potential cancer therapeutic strategy. *Cancer Med* 2021;10(8):2812–25. DOI: 10.1002/cam4.3836
36. Yadav M., Singh A.K., Kumar A. et al. An insight to heat shock protein 90: a remedy for multiple problems. *Curr Pharm Des* 2022;28(32):2664–76. DOI: 10.2174/1381612828666220829120630
37. Cheng M., Michalski S., Kommagani R. Role for growth regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB1) in hormone-dependent cancers. *Int J Mol Sci* 2018;19(9):2543. DOI: 10.3390/ijms19092543
38. Qie S., Diehl J.A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl)* 2016;94(12):1313–26. DOI: 10.1007/s00109-016-1475-3
39. De U., Chun P., Choi W.S. et al. A novel anthracene derivative, MHY412, induces apoptosis in doxorubicin-resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells through cell cycle arrest and downregulation of P-glycoprotein expression. *Int J Oncol* 2014;44(1):167–76. DOI: 10.3892/ijo.2013.2160
40. Piven Y.A., Zinovich V.G., Shcherbakov D.N. et al. Computer-aided design, synthesis and evaluation of new SARS-CoV-2 Mpro inhibitors based on 1,5,6,7-tetrahydro-4H-indazol-4-one scaffold. *Med Chem Res* 2023;33(1):151–63. DOI: 10.1007/s00044-023-03174-z
41. Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S. et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21(7):440–6. DOI: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56
42. O'Reilly M., Mellotte G., Ryan B. et al. Gastrointestinal side effects of cancer treatments. *Ther Adv Chronic Dis* 2020;11: 2040622320970354. DOI: 10.1177/2040622320970354
43. Jin H., Wang L., Bernards R. Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2023;22(3):213–34. DOI: 10.1038/s41573-022-00615-z
44. Kau T.R., Schroeder F., Ramaswamy S. et al. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 2003;4(6):463–76. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00303-9
45. Scherbakov A.M., Bogdanov F.B., Mikhaylova A.L. et al. Targeting AKT kinase in hydroxytamoxifen-resistant breast cancer cells. *Med Sci Forum* 2023;20(1):4. DOI: 10.3390/IECC2023-14224

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность А. Тищенко за помощь в организации биологических экспериментов и проведении иммуноблоттинга, G. Reid и F. Gannon за предоставление плазмид для трансфекции, а также А. Хамидуллиной и Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБН «Институт биологии гена Российской академии наук» за предоставление оборудования (микропланшетного спектрофотометра).

Acknowledgment. The authors express special gratitude to A. Tishchenko for assistance in organizing biological experiments and conducting immunoblotting, G. Reid and F. Gannon for providing plasmids for transfection, as well as A. Hamidullina and the Center for High-Precision Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences for providing equipment (microplate spectrophotometer).

Вклад авторов

А.М. Щербаков: идея и организация исследования, культивирование клеток, анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи, подготовка иллюстраций;

Д.В. Сорокин: анализ полученных данных, электрофорез белков, проведение иммуноблоттинга, написание текста статьи, подготовка иллюстраций;

Д.И. Сальникова: культивирование клеток, проведение МТТ-теста, разработка синергетической комбинации, статистическая обработка данных, редактирование, подготовка иллюстраций;

М.В. Гудкова: обработка результатов экспериментов, написание текста статьи, редактирование;

О.Е. Андреева: проведение трансфекции и репортерного анализа;

А.Л. Михайлова: анализ полученных данных, написание текста статьи, подготовка иллюстраций;

А.О. Воробьева: дизайн и синтез соединения;

Ю.А. Пивень: дизайн соединения, молекулярное моделирование, написание текста статьи, подготовка иллюстраций.

Authors' contributions

A.M. Scherbakov: idea and organization of the study, cell culture, analysis of the data obtained, statistical data processing, article writing, preparation of illustrations;

D.V. Sorokin: analysis of the data obtained, protein electrophoresis, immunoblotting, article writing, preparation of illustrations;

D.I. Salnikova: cell cultivation, MTT test, development of a synergistic combination, statistical data processing, editing, preparation of illustrations;

M.V. Gudkova: processing the results of experiments, article writing, editing;

O.E. Andreeva: transfection and reporter analysis;

A.L. Mikhaylova: analysis of the data obtained, article writing, preparation of illustrations;

N.A. Varabyeva: design and synthesis of the compound;

Yu.A. Piven: compound design, molecular modeling, article writing, preparation of illustrations.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

Д.И. Сальникова / D.I. Salnikova: <https://orcid.org/0000-0002-0809-3710>

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

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

А.Л. Михайлова / A.L. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0003-4022-6058>

А.О. Воробьева / N.A. Varabyeva: <https://orcid.org/0000-0003-4256-6646>

Ю.А. Пивень / Yu.A. Piven: <https://orcid.org/0000-0003-3640-0981>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (анализ сигнальных путей HSP90; проект № 24-15-00273) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (дизайн и синтез ингибитора HSP90; проект № X22MC-030).

Funding. This research was partly funded by the Russian Scientific Foundation (analysis of HSP90 signaling pathways; project No. 24-15-00273) and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (HSP90 inhibitor design and synthesis; project No. X22MC-030).

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 25.10.2024. **Принята к публикации:** 01.11.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

Article submitted: 25.10.2024. **Accepted for publication:** 01.11.2024. **Published online:** 11.12.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-66-79>

Молекулярные механизмы действия кураксина CBL0137 на клетки рака молочной железы *in vitro*

В.Г. Попова^{1,2}, Е.С. Лылова¹, А.Ю. Букина¹⁻³, К.А. Зимин⁴, М.К. Хирин⁴, Е.М. Жидкова¹, Е.С. Трапезникова^{1,5}, М.Г. Якубовская^{1,2}, В.П. Максимова¹, К.И. Кирсанов^{1,2}

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

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

³ФГБУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, пр-кт Вернадского, 78;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 6;

⁵ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов kkirsanov85@yandex.ru

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – злокачественные новообразования с различным молекулярным профилем, для которых характерны aberrации в механизмах эпигенетической регуляции транскрипции. Одним из таких нарушений, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом, является гиперэкспрессия белков семейства BET, ответственных за взаимодействие транскрипционных факторов и областей, богатых ацетилированными гистонами. Ранее мы выявили способность мультитаргетного эпигенетически активного агента кураксина CBL0137 (CBL) ингибировать экспрессию белков BRD2, BRD3, BRD4 в клетках HeLa TI и белков BRD3, BRD4 в клетках РМЖ.

Цель исследования – анализ молекулярных механизмов действия CBL на клетки РМЖ *in vitro*, включая оценку: 1) его цитотоксичности, 2) влияния на клеточный цикл, 3) способности запускать апоптоз, 4) способности вызывать повреждения ДНК, 5) воздействия на экспрессию генов, вовлеченных в процессы пролиферации, апоптоза и репарации.

Материалы и методы. Цитотоксичность CBL в отношении клеток РМЖ (MCF7, MDA-MB-231, SKBR3) оценивали с помощью МТТ-теста. Влияние агента на клеточный цикл и активацию апоптоза анализировали методом проточной цитометрии. Для анализа повреждения ДНК при действии CBL использовали метод ДНК-комет. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, репарацией и апоптозом, оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) на клетках РМЖ при действии CBL0137 составили 1 мкМ при 72-часовой экспозиции, 14–25 мкМ – при 24-часовой. Кураксин CBL (в концентрациях 0,5 и 1 мкМ) вызывал арест клеточного цикла G2/M, а также запускал апоптоз во всех клеточных линиях. При действии 1 мкМ CBL зарегистрировано повышение степени повреждения ДНК в клетках MCF7 и SKBR3, при действии обеих концентраций – в клетках MDA-MB-231. Профиль экспрессии генов, вовлеченных в пролиферацию, также отвечал остановке в G2/M-фазе клеточного цикла. Также при действии CBL происходила активация p53-зависимых генов репарации. Выявлено увеличение экспрессии проапоптотических генов и снижение экспрессии антиапоптотических генов.

Заключение. Кураксин CBL0137 показал различное действие на молекулярные процессы в клетках РМЖ. Мы выявили цитостатический эффект этого соединения, подтвержденный на разных молекулярных уровнях. Полученные данные свидетельствуют о способности CBL ингибировать опухолевые процессы в клетках РМЖ, что делает его потенциальным агентом для комбинаторной терапии.

Ключевые слова: кураксин CBL0137, рак молочной железы, повреждение ДНК, пролиферация, репарация, апоптоз

Для цитирования: Попова В.Г., Лылова Е.С., Букина А.Ю. и др. Молекулярные механизмы действия кураксина CBL0137 на клетки рака молочной железы *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):66–79.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-66-79>

Molecular mechanisms of action of curaxin CBL0137 on breast cancer cells *in vitro*

V.G. Popova^{1,2}, E.S. Lylova¹, A.Yu. Bukina¹⁻³, K.A. Zimin⁴, M.K. Khirin⁴, E.M. Zhidkova¹, E.S. Trapeznikova^{1,3}, M.G. Yakubovskaya^{1,2}, V.P. Maksimova¹, K.I. Kirsanov^{1,2}

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

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³MIREA – Russian Technological University; 78 Vernadskogo Prospekt, Moscow 119454, Russia;

⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 6, 1 Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia;

⁵Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Contacts: Kirill Igorevich Kirsanov kkirsanov85@yandex.ru

Introduction. Breast cancer (BC) represents a group of malignant neoplasms with various molecular profiles, which are characterized by aberrations in the mechanisms of epigenetic transcription regulation. One of these disruptions associated with a worse prognosis is the overexpression of the BET protein family, responsible for the interaction of transcription factors with histone-rich acetylated regions. Previously, for the multitargeted epigenetically active agent curaxin CBL0137 (CBL), we have shown the ability to inhibit the expression of BRD2, BRD3, BRD4 proteins in HeLa TI cells and BRD3, BRD4 proteins in BC cells.

Aim. To analyze the molecular mechanisms of CBL0137 action on BC cells *in vitro*, including: 1) assessment of cytotoxicity, 2) analysis of the effect on the cell cycle, 3) assessment of the ability to trigger apoptosis, 4) cause DNA damage, and 5) analyze the effect on the expression of genes involved in proliferation, apoptosis and repair processes.

Materials and methods. The cytotoxicity of CBL on BC cells (MCF7, MDA-MB-231, SKBR3) was assessed using the MTT assay. The effect of the agent on the cell cycle and activation of apoptosis was analyzed by flow cytometry. Analysis of DNA damage under the action of CBL was performed using the comet assay. Changes in the expression of genes associated with proliferation, repair and apoptosis were evaluated using real-time polymerase chain reaction.

Results. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) on BC cells under the action of CBL0137 were 1 μM at 72-hour exposure, 14–25 μM at 24-hour. Curaxin CBL (0.5 and 1 μM) caused G2/M cell cycle arrest, and also triggered apoptosis in all cell lines. Under the action of 1 μM CBL, an increase in the degree of DNA damage in MCF7 and SKBR3 cells was recorded, and under the action of both concentrations in MDA-MB-231 cells. The gene expression profile involved in proliferation also corresponded to the arrest in the G2/M phase of the cell cycle. Also, under the action of CBL, the activation of p53-dependent repair genes occurred. An increase in the expression of pro-apoptotic and a decrease in anti-apoptotic genes was shown.

Conclusion. Curaxin CBL0137 showed differential effects on molecular processes in BC cells. We have identified a cytostatic effect of the compound, confirmed at various molecular levels. The data obtained indicate the ability of CBL0137 to inhibit tumor processes in BC cells, which makes it a potentially interesting agent for combination therapy.

Keywords: curaxin CBL0137, breast cancer, DNA damage, proliferation, repair, apoptosis

For citation: Popova V.G., Lylova E.S., Bukina A.Yu. et al. Molecular mechanisms of action of curaxin CBL0137 on breast cancer cells *in vitro*. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):66–79. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-66-79>

ВВЕДЕНИЕ

Формирование злокачественных новообразований (ЗНО) представляет собой сложный процесс, запускаемый и поддерживаемый генетическими нарушениями и aberrациями в механизмах эпигенетической регуляции транскрипции. Ключевыми эпигенетическими механизмами развития и прогрессии ЗНО являются метилирование ДНК, ацетилирование и метилирование гистонов. Обратимость, характерная для данных модификаций, привела к поиску и разработке эпигенетических модуляторов, влияющих на активность ферментов, отвечающих за структурное состояние хроматина и его модификации [1].

Одним из ЗНО, в прогрессии которого главную роль играют эпигенетические aberrации, является рак молочной железы (РМЖ) [2], являющийся гетерогенным заболеванием. Выделяют несколько подтипов РМЖ: люминальный А (ER+/PR+/HER2–) (ER – рецептор

эстрогена; PR – рецептор прогестерона; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа), люминальный В HER2-положительный (ER+/PR+/HER2+), люминальный В HER2-отрицательный (ER+/PR–/HER2–), нелюминальный HER2-положительный (ER–/PR–/HER2+) и трижды негативный (ER–/PR–/HER2–) [3]. Независимо от подтипа для РМЖ характерны aberrации в механизме ацетилирования гистонов. У пациентов с данной патологией наблюдается значительное снижение уровня ацетильных модификаций в сайтах H3K4, H3K9 и H3K18, которое ассоциируется с худшим прогнозом [4, 5]. Также обнаружено закономерное увеличение экспрессии ферментов гистоновых деацетилаз (HDACs) HDAC1, HDAC2, HDAC3, SIRT1, SIRT7 [6–8] и снижение экспрессии ряда гистоновых ацетилтрансфераз (HATs), таких как Trrb60, MYST1 и KAT9 [4, 9, 10]. При этом наблюдается значительная гиперэкспрессия транскрипционных

коактиваторов из группы НАТ – СВР и P300, ассоциированная с худшим прогнозом [11]. Также для клеток РМЖ характерно изменение экспрессии белков семейства ВЕТ, осуществляющих коактивацию транскрипции посредством взаимодействия с ацетилированными гистонами и различными транскрипционными факторами [12]. Показано, что у пациентов с РМЖ происходит увеличение экспрессии онкогенной изоформы белка BRD4 – BRD4-S. Также продемонстрирована связь между активностью BRD4 и способностью клеток РМЖ к миграции и инвазии [11, 13]. В HER2-положительных опухолях повышенная экспрессия гена *BRD2* ассоциирована с неблагоприятным прогнозом (низкими показателями безрецидивной выживаемости) [14]. Показана способность BRD3 и BRD4 активировать экспрессию *ER* и генов семейства *MYC* [15–17].

Ингибирование активности ферментов классов HDAC, НАТ и ВЕТ является одним из разрабатываемых подходов к совершенствованию противоопухолевой терапии РМЖ [3]. Ингибиторы HDAC представляют собой единственный класс модуляторов ацетилирования гистонов, одобренных для терапии. Однако клинические испытания препаратов этой группы в основном не показали высокой эффективности при РМЖ. Ингибитор CPI-1 из группы ингибиторов НАТ находится на этапе доклинических испытаний. Несколько ингибиторов ВЕТ показали высокую эффективность на моделях РМЖ *in vitro* и *in vivo* и в настоящее время проходят клинические исследования [18]. Тем не менее актуальной задачей онкологии остается разработка новых ингибиторов ВЕТ, а также поиск агентов среди препаратов, применяемых для терапии других ЗНО или используемых в других областях медицины.

СВL0137 (СВL) – кураксин II поколения, представляющий собой низкомолекулярное ДНК-связывающее соединение из класса карбазолов. Он интеркалирует ДНК с последующей дестабилизацией нуклеосом и ингибированием белкового комплекса FACT (facilitates chromatin transcription). При действии СВL FACT образует стабильный комплекс с хроматином и задерживается в нем, что приводит к ингибированию FACT-зависимой транскрипции, в том числе NF-κB-опосредованной транскрипции (NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κ). Кроме того, связывание FACT с хроматином приводит к активации р53 [19]. Кураксин СВL способен подавлять транскрипцию, активированную энхансерами и суперэнхансерами, которая имеет решающее значение для экспрессии онкогенов, например из семейства *MYC* [20]. В то же время при действии СВL происходит активация гена опухолевого супрессора *NOTCH1* [21].

Ранее была показана способность СВL активировать эпигенетически репрессированный ген *GFP* в клетках HeLa T1 [22]. Результаты анализа механизмов эпигенетического действия продемонстрировали способность СВL ингибировать экспрессию белков

BRD2, BRD3 и BRD4 в клетках HeLa T1, что говорит о его потенциале как ингибиторе ВЕТ [23]. Далее было показано, что при 24-часовом действии СВL происходит значительное снижение количества белков BRD3 и BRD4 в клетках РМЖ различных молекулярных подтипов (данные не опубликованы).

Цель исследования – анализ молекулярных механизмов действия СВL на клетки РМЖ *in vitro*, включая оценку: 1) его цитотоксичности, 2) влияния на клеточный цикл, 3) способности запускать апоптоз, 4) способности вызывать повреждения ДНК, 5) воздействия на экспрессию генов, вовлеченных в процессы пролиферации, апоптоза и репарации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Использованы клеточные линии аденокарциномы молочной железы 3 подтипов: люминального А (ER+, PR+, HER2–) (MCF7), трижды негативного (ER–, PR–, HER2–) (MDA-MB-231) и HER2-положительного (ER–, PR–, HER2+) (SKBR3).

Клетки получены из азотного банка Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Клетки MCF7 и MDA-MB-231 культивировали в DMEM с добавлением 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия), 10 % (v/v) термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS; Biosera, Франция), смеси антибиотиков, содержащей пенициллин (50 ЕД/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). Клетки SKBR3 культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с 10 % (v/v) термически инактивированной FBS (Biosera, Франция), смеси антибиотиков, содержащей пенициллин (50 ЕД/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия) и 1 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). Клетки пассировали при соотношении 1:5 каждые 3–4 дня, культивирование проводили в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂) не дольше 2 мес.

Анализ цитотоксичности СВL. Цитотоксичное влияние СВL на клетки РМЖ определяли с помощью МТТ-теста. Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (SPL Lifescience, Корея) по 5 × 10³ клеток на лунку. Через 24 ч их обрабатывали 2-кратными серийными разведениями СВL (конечные концентрации от 0,8 мМ до 0,02 мкМ). Все обработки проводились в трех технических повторах. Клетки инкубировали с СВL в течение 24 и 72 ч (37 °С, 5 % CO₂). После инкубации добавляли МТТ-реагент (0,25 мг/мл) (Alfa Aesar, Германия) и инкубировали в течение 4 ч (37 °С, 5 % CO₂). После инкубации среду удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) («ПанЭко», Россия) для растворения кристаллов формазана.

Изменения оптической плотности регистрировали при длине волны 540 нм с помощью спектрофотометра Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США).

Концентрации IC_{50} определяли с помощью GraphPad Prism 8.3.0 методом нелинейной регрессии. Нетоксичные (ингибирующие на 10 % (IC_{10})) и субтоксичные (ингибирующие на 30 % (IC_{30})) концентрации выбраны по результатам МТТ-теста на основании кривых доза–эффект. Эксперимент проводили не менее 5 раз.

Анализ влияния СВЛ на клеточный цикл. Влияние СВЛ на клеточный цикл определяли с помощью проточной цитометрии (FACS). Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 24-луночный планшет (SPL Lifescience, Корея) по 20×10^3 клеток в лунку. Через 24 ч проводили смену среды и обрабатывали клетки СВЛ в концентрациях 0,5 мкМ и 1 мкМ, после чего инкубировали в течение 72 ч (37°C , 5 % CO_2). Конечная концентрация ДМСО в среде составляла не более 0,1%. После инкубации клетки отмывали в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) (1500 об/мин, 5 мин), фиксировали в 70 % этаноле (не менее 2 ч) и окрашивали пропидий йодидом (PI, Invitrogen, США). Распределение клеток по фазам клеточного цикла детектировали на проточном цитометре BD FACS Canto II (США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.3.0 методом двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Эксперимент выполняли в двух технических повторах не менее 5 раз.

Анализ влияния СВЛ на активацию апоптоза. Влияние СВЛ на активацию апоптоза в клетках РМЖ определяли с помощью FACS. Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 24-луночный планшет (SPL Lifescience, Корея) по 25×10^3 клеток в лунку. Через 24 ч проводили смену среды и обрабатывали СВЛ в концентрациях 0,5 и 1 мкМ. Конечная концентрация ДМСО в среде составляла не более 0,1 %. Клетки инкубировали с СВЛ в течение 48 ч (37°C , 5 % CO_2). Анализ активации апоптоза осуществляли с помощью коммерческого набора для прижизненной покраски клеток FITC-Annexin V и PI (BioLegend, Великобритания) по протоколу производителя. Апоптотические изменения в клетках детектировали на проточном цитометре BD FACS Canto II. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 3 % раствором формалина в течение 15 мин при 4°C .

Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 8.3.0 методом двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. Эксперимент выполняли в двух технических повторах не менее 3 раз.

Анализ повреждения ДНК. Способность СВЛ вызывать повреждение ДНК анализировали с помощью метода ДНК-комет (Comet assay). Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 24-луночный планшет (SPL Lifescience, Корея) по 70×10^3 клеток в лунку. Через 24 ч клетки обрабатывали СВЛ в концентрациях 0,5 и 1 мкМ. Конечная концентрация ДМСО в среде составляла не более 0,1 %. После 24-часовой

инкубации клетки отмывали в PBS (1500 об/мин, 5 мин). Далее осадок клеток ресуспендировали в PBS и добавляли в раствор 4 % легкоплавкой агарозы (1:8 v/v; 37°C). Смесь наносили на слайд и охлаждали для застывания в темноте в течение 15 мин (4°C). Далее осуществляли лизис клеток (1 ч, 4°C) и денатурирующую инкубацию в щелочном растворе (30 мин, 4°C). Затем проводили электрофорез (30 мин, 1 В/см) в буфере TBE (pH 8,3). Далее клетки фиксировали в 70 % этаноле в течение 5 мин и окрашивали раствором красителя Sybr Gold (Invitrogen, США) с конечной концентрацией 1:10 000. Микропрепараты анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) при $\times 10$. Степень повреждения ДНК определяли по параметру момент хвоста с помощью программы CometScore 2.0. В качестве положительного контроля использовали 0,01 % пероксид водорода (H_2O_2).

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.3.0. Выбросы в наборах данных определяли с помощью метода Rout ($Q = 1\%$). Статистически значимые различия относительно контроля выявляли с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллеса.

Анализ влияния СВЛ на гены, отвечающие за пролиферацию, репарацию и апоптоз. Изменения экспрессии генов в клеточных линиях MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 при действии СВЛ проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клетки MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3 высевали в 6-луночные планшеты (SPL Lifescience, Корея) по 200×10^3 в лунку, затем через 24 ч обрабатывали 0,5 и 1 мкМ СВЛ. Далее из клеток выделяли РНК с помощью фенол-хлороформной экстракции реактивом ExtraRNA («Евроген», Россия). Для избежания контаминации проб геномной ДНК образцы обрабатывали ДНКазой («Синтол», Россия), затем проводили переосаждение РНК методом фенол-хлороформной экстракции. Синтез комплементарной ДНК осуществляли с помощью коммерческого набора для обратной транскрипции («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с помощью прибора CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США).

Для анализа экспрессии генов использовали запатентованную панель праймеров, разработанную в отделе химического канцерогенеза Научно-исследовательского института канцерогенеза Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина в рамках выполнения кластерного проекта № 121120100382-1. Изменения уровней экспрессии матричной РНК (мРНК) исследуемых генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Экспрессию генов интереса нормализовали относительно гена домашнего хозяйства *RPLP0*. Все эксперименты выполнены в трех технических повторах не менее 3 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое действие CBL. С помощью МТТ-теста определен профиль токсичности CBL в отношении клеток РМЖ различных подтипов. Концентрации IC_{50} для всех линий находились в микромолярном диапазоне. При экспозиции 72 ч IC_{50} для клеток MCF7 составила $0,98 \pm 0,14$ мкМ, для клеток MDA-MB-231 – $1,05 \pm 0,22$, для клеток SKBR3 – $0,91 \pm 0,16$ мкМ (рис. 1, а).

в клеточном цикле при действии CBL в нетоксичной концентрации (0,1 мкМ) (см. рис. 2, в, з). При этом зарегистрировано уменьшение количества клеток в фазе G1 с 61,9 до 29,6 % при действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ, которое сопровождалось увеличением доли клеток в фазе G2/M с 24,4 (в контроле) до 55,4 и 35,6 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно.

Влияние CBL на запуск апоптоза. Проведен анализ активации апоптоза в клетках РМЖ при действии CBL

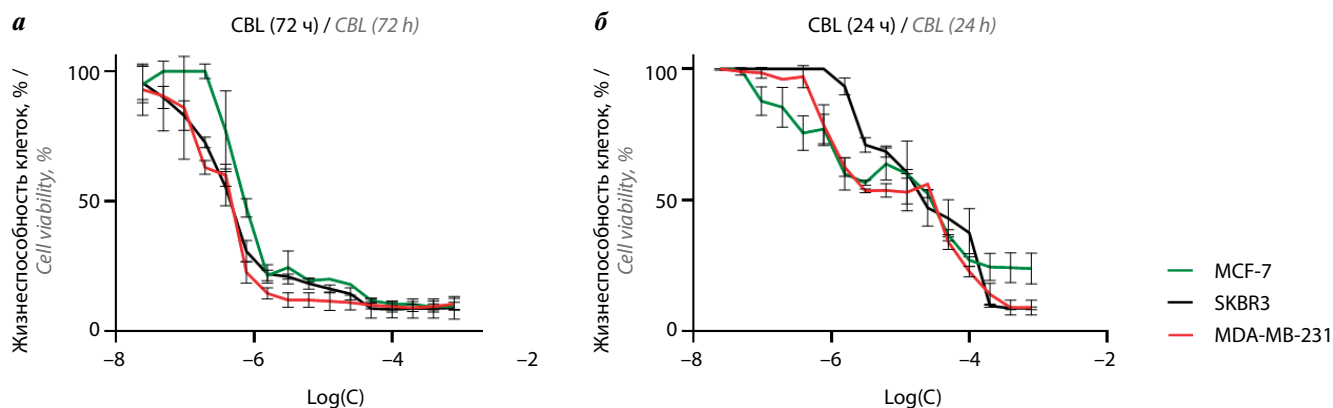


Рис. 1. Анализ цитотоксического действия CBL на клетки рака молочной железы: а – экспозиция 72 ч; б – экспозиция 24 ч. Результаты МТТ-теста. Жизнеспособность клеток представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение

Fig. 1. Analysis of cytotoxic effect of CBL on breast cancer cells: а – 72 h exposure; б – 24 h exposure. Results of the MTT assay. Cell viability is presented as mean \pm standard deviation

При экспозиции 24 ч CBL был менее токсичен: IC_{50} для клеток MCF7 составила $17,6 \pm 1,6$ мкМ (рис. 1, б), для клеток MDA-MB-231 – $14,4 \pm 0,96$ мкМ, для клеток SKBR3 – $24,7 \pm 1,86$ мкМ.

Влияние CBL на клеточный цикл. По результатам МТТ-теста для каждой линии выбраны нетоксичная (IC_{10}), субтоксичная (IC_{30}) и токсичная (IC_{50}) концентрации CBL при экспозиции 72 ч. В концентрации 0,05 мкМ (IC_{10}) CBL не вызывал изменения распределения клеток MCF7 по фазам клеточного цикла (см. рис. 2, а, з).

При действии CBL 0,5 мкМ (IC_{30}) в клетках MCF7 зафиксировано уменьшение количества клеток в фазе G1 с 55,6 (в контроле) до 15,3 и 26,9 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно; доля клеток в фазе G2/M увеличилась с 32,5 (в контроле) до 65,9 и 59,7 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно. Также стоит отметить статистически значимое увеличение числа клеток в фазе S – с 10,9 до 18,3 % – при действии CBL 0,5 мкМ. После обработки клеток SKBR3 0,2 мкМ CBL не происходило изменений в клеточном цикле (см. рис. 2, б, з). В то же время при действии 0,5 и 1 мкМ CBL выявлено снижение доли клеток в фазе G1 с 53,4 (в контроле) до 17,3 и 30,2 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно; также наблюдалось увеличение количества клеток в фазе G2/M с 32,5 (в контроле) до 61,7 и 49,5 % при IC_{30} и IC_{50} соответственно. Изменения в количестве клеток в фазе S при действии 0,5 и 1 мкМ CBL не выявлены. В клетках MDA-MB-231 не детектировано изменений

в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в течение 48 ч. Клетки MCF7 и SKBR3 имели схожее распределение по стадиям апоптоза. Жизнеспособность клеток MCF7 снизилась с 90,9 до 66,6 % (при обработке 0,5 мкМ CBL) и до 70,3 % (при обработке 1 мкМ CBL), при этом зарегистрировано увеличение количества клеток с поздними апоптотическими изменениями – с 9,8 (в контроле) до 29,4 (при действии 0,5 мкМ CBL) и 25,2 % (при действии 1 мкМ CBL) (рис. 3, а).

В клетках SKBR3 зарегистрировано снижение жизнеспособности клеток при действии 0,5 мкМ CBL: доля живых клеток уменьшилась с 92,4 до 69,6 %. При действии 1 мкМ CBL этот показатель снизился до 82,6 %. Доля клеток с поздними апоптотическими изменениями статистически значимо повысилась с 4,3 % в контроле до 25,6 % при действии 0,5 мкМ CBL и до 14,3 % при действии 1 мкМ CBL (рис. 3, б). Для MCF7 и SKBR3 повышения доли клеток с ранним апоптозом или некротическими изменениями после обработки CBL детектировано не было.

После обработки клеток MDA-MB-231 0,5 мкМ CBL наблюдали снижение доли жизнеспособных клеток с 89,9 до 24,2 %, после обработки 1 мкМ CBL – до 52,5 % (рис. 3, в). Количество клеток с признаками позднего апоптоза увеличилось с 5,7 в контроле до 46,9 % при действии 0,5 мкМ CBL и до 26,1 % при действии 1 мкМ CBL. Также зарегистрировано значимое повышение количества клеток с ранними апоптотическими изменениями: с 4 до 28,7 %

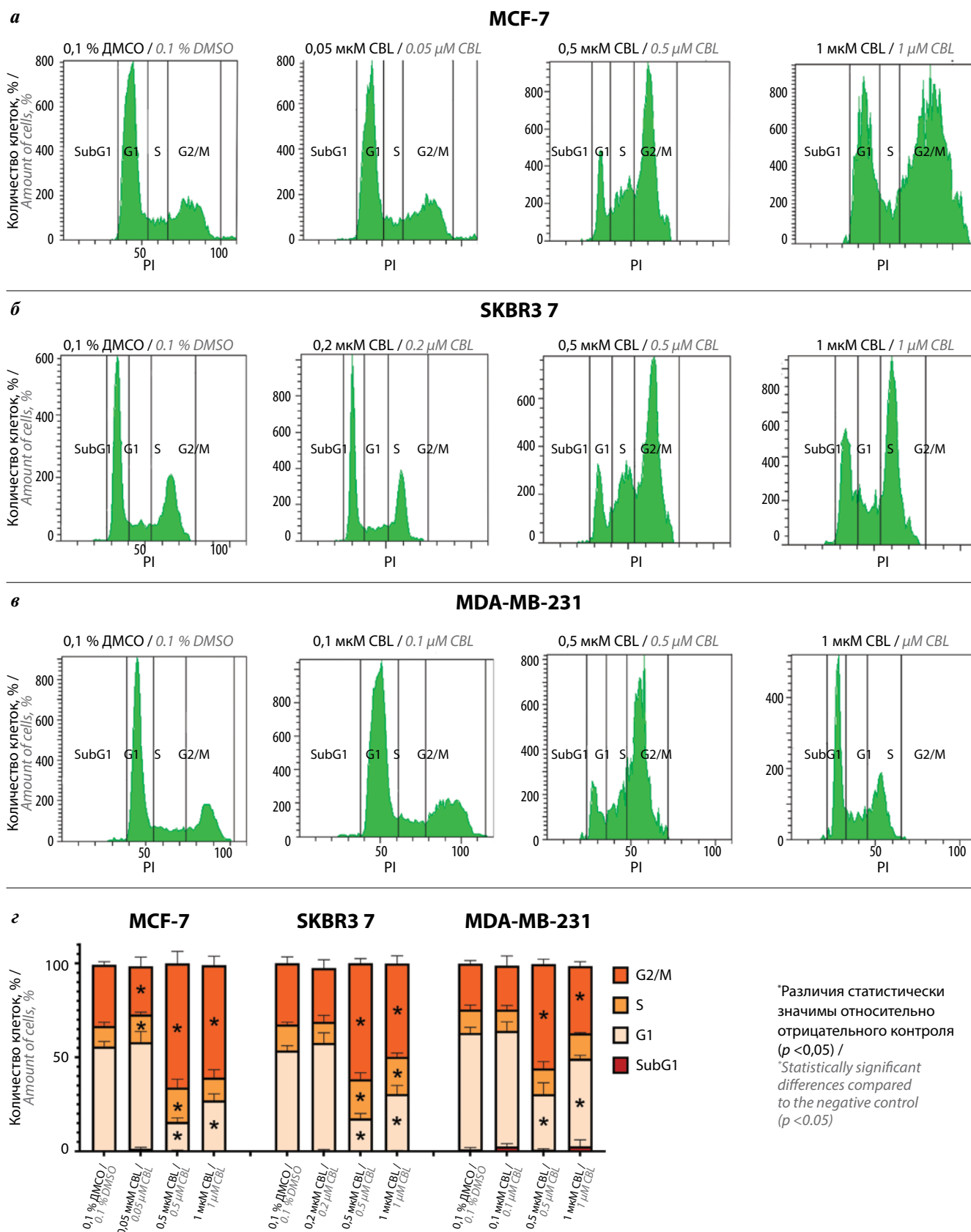
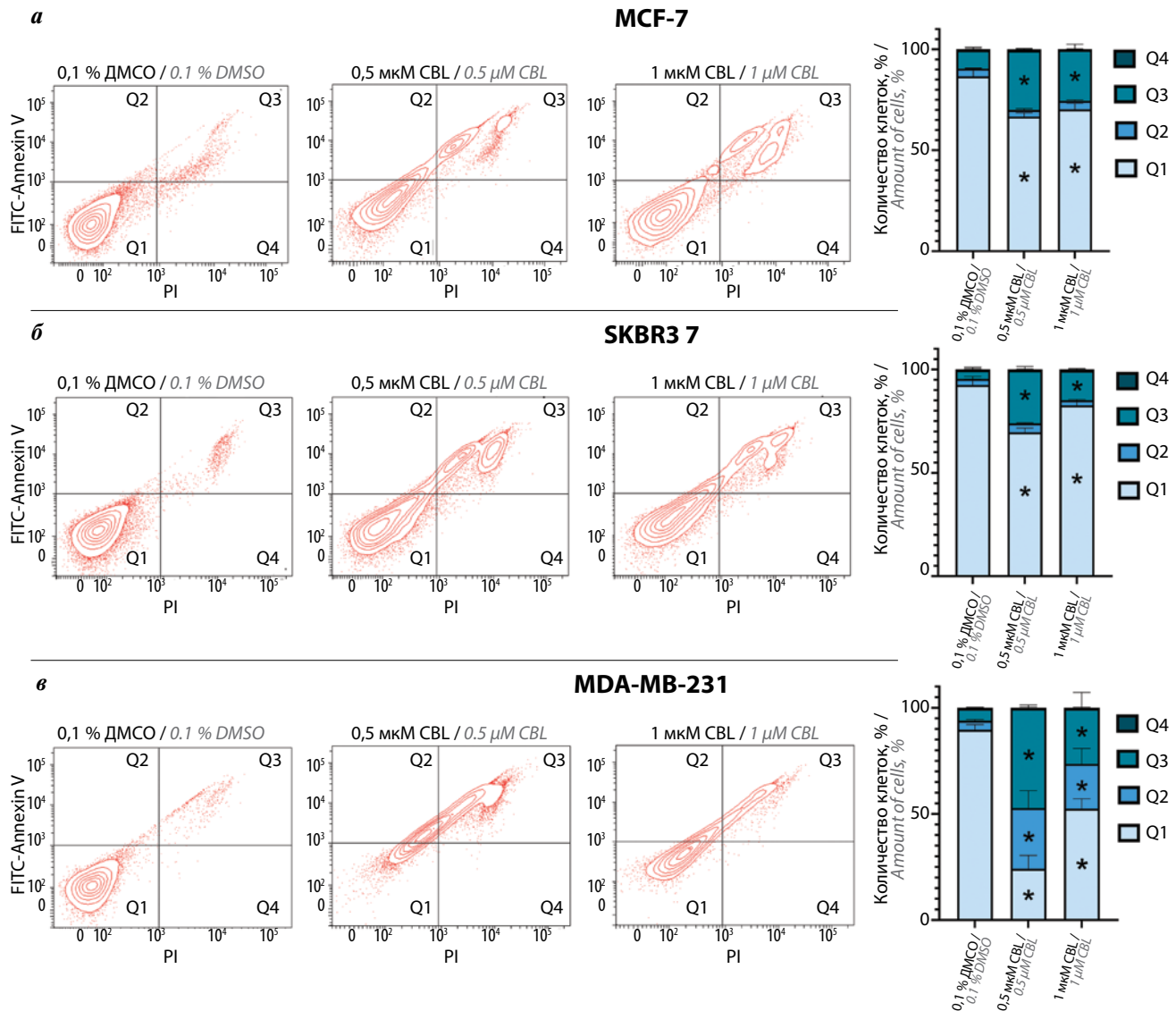


Рис. 2. Анализ влияния CBL0137 на клеточный цикл клеток рака молочной железы. Результаты проточной цитометрии при экспозиции 72 ч для клеток MCF7 (а), MDA-MB-231 (б) и SKBR3 (в). Распределение клеток по фазам клеточного цикла, представленное как среднее значение \pm стандартное отклонение (г). ДМСО – диметилсульфоксид

Fig. 2. Analysis of the effect of CBL0137 on the cell cycle of breast cancer cells. Results of flow cytometry after 72 h exposure for MCF7 (a), MDA-MB-231 (б) and SKBR3 (в) cells. Distribution of cells per cell cycle phases presented as mean \pm standard deviation (г). DMSO – dimethyl sulfoxide



*Различия статистически значимы относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$) /
*Statistically significant differences compared to the negative control ($p < 0,05$)

Рис. 3. Анализ влияния CBL на активацию апоптоза в клетках рака молочной железы. Результаты проточной цитометрии при экспозиции 48 ч для клеток MCF7 (а), MDA-MB-231 (б) и SKBR3 (в). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Q1 – живые клетки; Q2 – ранний апоптоз; Q3 – поздний апоптоз; Q4 – некроз; ДМСО – диметилсульфоксид

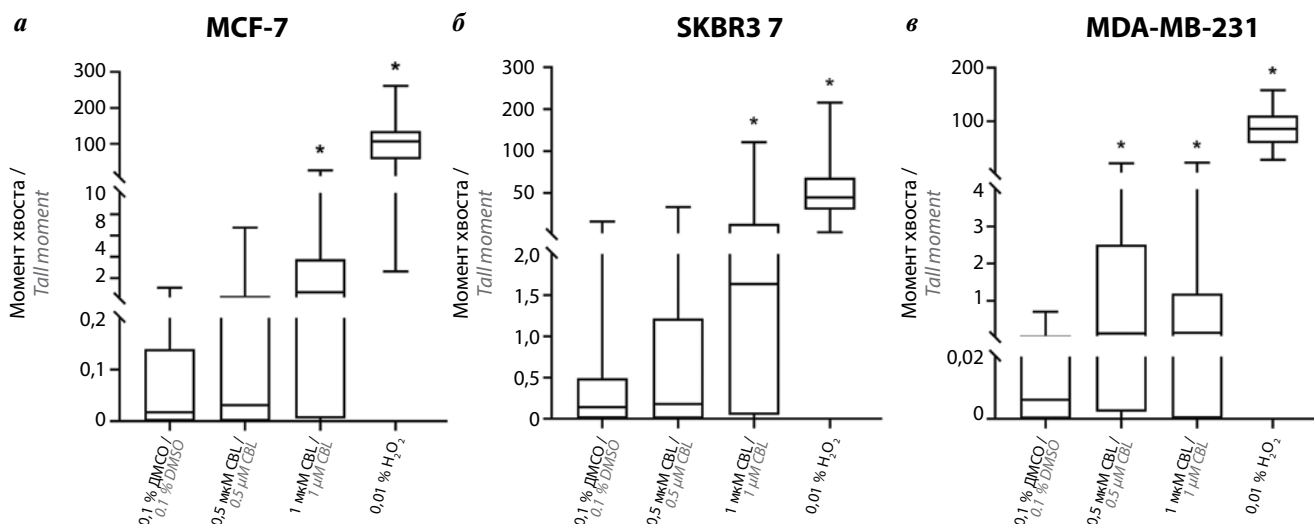
Fig. 3. Analysis of the effect of CBL on activation of apoptosis in breast cancer cells. Results of flow cytometry after 48 h exposure for MCF7 (a), MDA-MB-231 (б) and SKBR3 (в) cells. Results are presented as mean \pm standard deviation. Q1 – living cells; Q2 – early apoptosis; Q3 – late apoptosis; Q4 – necrosis; DMSO – dimethyl sulfoxide

(при действии 0,5 мкМ CBL) и до 21,1 % (при действии 1 мкМ CBL).

Влияние CBL на повреждение ДНК. Оценку степени повреждения ДНК проводили методом ДНК-комет при действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в течение 24 ч. В качестве положительного контроля использовали 0,01 % H_2O_2 – сильный окислительный агент, способный вызывать одно- и двунитевые разрывы ДНК. Показано, что при действии 1 мкМ CBL в клетках MCF7 и SKBR3 происходит повышение степени повреждения ДНК. В клетках MCF7 при действии отрицательного контроля (0,01 % ДМСО)

медиана момента хвоста составила 0,02 (0,00; 0,14), после их обработки 0,5 мкМ CBL – 0,03 (0,00; 0,30), 1 мкМ CBL – 0,68 (0,01; 3,76) (рис. 4, а).

При действии H_2O_2 медиана момента хвоста повысилась до 106,3 (49,9; 134,6). В клетках SKBR3 при действии 0,1 % ДМСО она составила 0,01 (0,00; 0,13), 0,5 мкМ CBL – 0,01 (0,00; 0,13), 1 мкМ CBL – 0,24 (0,00; 2,58) (рис. 4, б). После обработки клеток H_2O_2 этот показатель оказался равен 42,76 (29,42; 60,81). В клетках MDA-MB-231 мы наблюдали повышение степени повреждения ДНК при действии 0,5 мкМ и 1 мкМ CBL. После обработки клеток 0,1 % ДМСО



*Различия статистически значимы относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$) / *Statistically significant differences compared to the negative control ($p < 0.05$)

Рис. 4. Анализ способности CBL вызывать повреждение ДНК. Результаты анализа ДНК-комет при экспозиции 24 ч для клеток MCF7 (а), SKBR3 (б) и MDA-MB-231 (в). Результаты представлены как медиана (25-й квартиль; 75-й квартиль). DMSO – диметилсульфоксид
Fig. 4. Analysis of the capability of CBL to cause DNA damage. Results of DNA comet assay after 24 h exposure for MCF7 (a), SKBR3 (б) and MDA-MB-231 (в). Results are presented as median (25th quartile; 75th quartile). DMSO – dimethyl sulfoxide

момент хвоста составил 0,01 (0,00; 0,06), 0,5 мкМ и 1 CBL – 0,12 (0,00; 2,5) и 0,14 (0,00; 1,20) соответственно (рис. 4, в). Действие H₂O₂ вызвало повышение значения момента хвоста до 85,8 (59,5; 110,7).

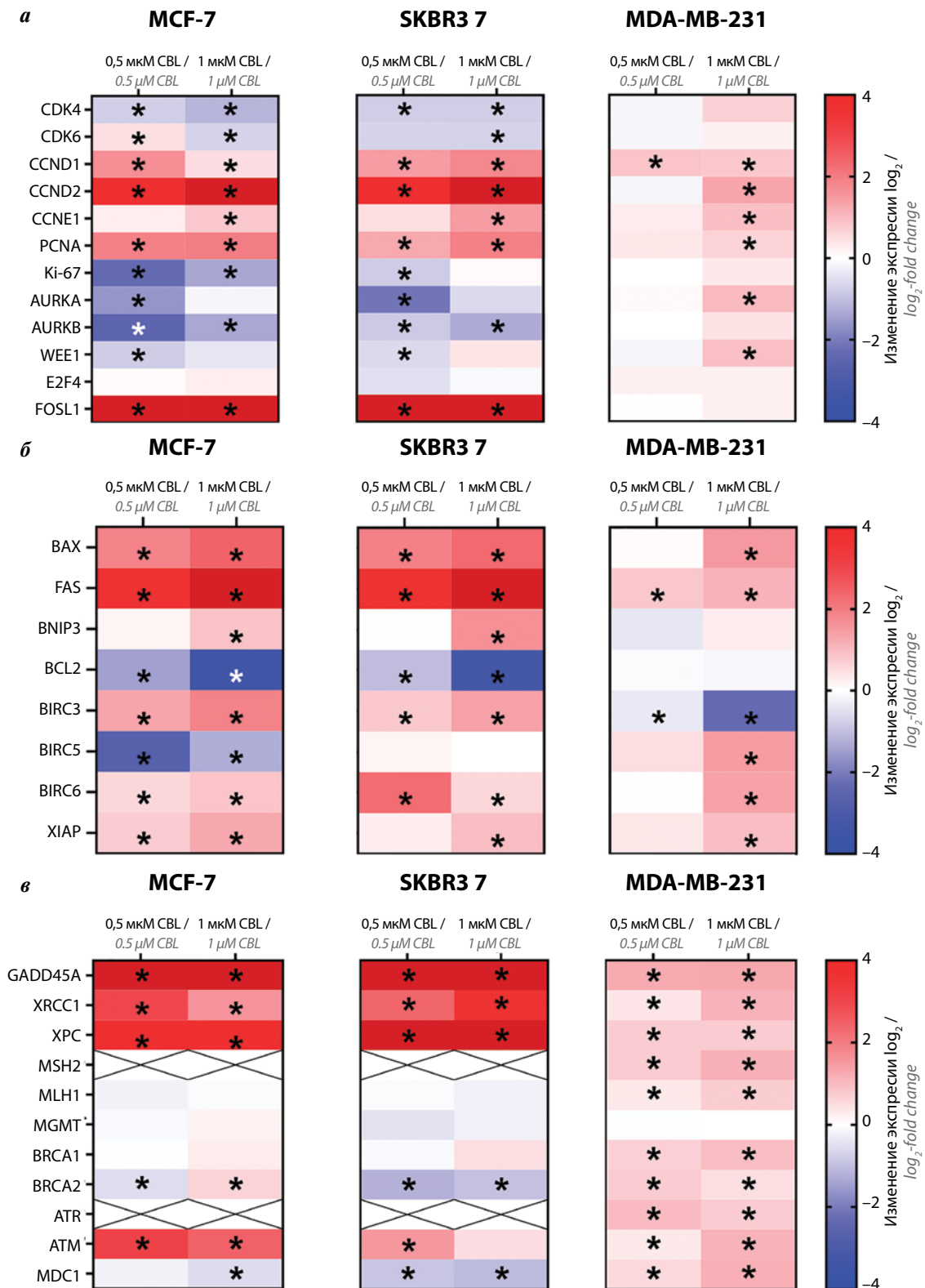
Влияние CBL на экспрессию генов пролиферации.

Для исследования выбраны гены *CDK4*, *CDK6*, *CCND1* и *CCND2*, ассоциированные с фазой G1 клеточного цикла, гены *CCNE1* и *PCNA*, экспрессирующиеся преимущественно в конце фазы G1 и фазе S клеточного цикла, маркеры делящихся клеток Ki-67, *AURKA*, *AURKB*, ген *WEE1*, кодирующий отрицательный регулятор входа в митоз, и гены активаторов транскрипции *E2F4* и *FOSL1*. Для анализа влияния CBL на экспрессию генов пролиферации использовали 2 его концентрации – 0,5 мкМ и 1 мкМ. Наиболее выраженные изменения наблюдали в клеточных линиях MCF7 и SKBR3: при действии даже одной из концентраций происходило изменение экспрессии 11 из 12 генов.

Показано, что при действии CBL в обеих концентрациях на клетки MCF7 и SKBR3 происходит статистически значимое снижение экспрессии гена *CDK4* в 1,7 раза, а также уменьшение экспрессии *CDK6* более чем в 1,5 раза при концентрации CBL 1 мкМ (рис. 5, а).

Кураксин CBL в концентрации 0,5 мкМ вызывал небольшое статистически значимое увеличение экспрессии *CDK6* в клетках MCF7 при отсутствии эффекта в клетках SKBR3. После обработки клеток MDA-MB-231 не происходило статистически значимых изменений уровней экспрессии генов *CDK4* и *CDK6*. Для клеток MCF7 и SKBR3 показано, что CBL в обеих концентрациях вызывает усиление экспрессии генов *CCND1* и *CCND2* в 1,5 и 4 раза соответственно. В клетках MDA-MB-231

при действии 0,5 и 1 мкМ CBL зарегистрировано увеличение в 1,5 раза количества мРНК гена *CCND1*, а при действии 0,5 мкМ – 2-кратное повышение экспрессии гена *CCND2*. Кураксин CBL в концентрации 1 мкМ вызывал усиление экспрессии гена *CCNE1* во всех клеточных линиях. Также мы наблюдали повышение в 2 раза экспрессии гена *PCNA* в клетках MCF7 и SKBR3 при действии CBL в обеих концентрациях и в 1,2 раза в клетках MDA-MB-231 при концентрации 1 мкМ. Уровень экспрессии гена *Ki-67*, ассоциированного с фазой G2/М клеточного цикла, статистически значимо снижался при обработке 0,5 и 1 мкМ CBL в MCF7 и 0,5 мкМ в SKBR3. В клетках MDA-MB-231 при действии CBL экспрессия этого гена не менялась. Экспрессия гена *AURKA* снижалась в 2 раза при действии 0,5 мкМ CBL в линиях MCF7 и SKBR3. В то же время после обработки клеток MDA-MB-231 1 мкМ CBL наблюдалось повышение экспрессии гена. Кураксин CBL в концентрациях 0,5 мкМ и 1 мкМ вызывал снижение экспрессии гена *AURKB* в 4 и 2,6 раза соответственно в клетках MCF7, и в 2 раза – в клетках SKBR3. В клетках MDA-MB-231 изменений экспрессии гена *AURKB* зарегистрировано не было. Для гена *WEE1* – отрицательного регулятора входа в митоз – показано статистически значимое снижение количества мРНК в клетках MCF7 и SKBR3 при концентрации CBL 0,5 мкМ, в то время как в клетках MDA-MB-231 происходило 2-кратное повышение экспрессии гена при концентрации CBL 1 мкМ. Экспрессия гена *E2F4* при действии CBL не менялась. Значительное изменение экспрессии под влиянием CBL отмечено для гена-активатора пролиферации *FOSL1*, экспрессия которого



*Различия статистически значимы относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$) /
*Statistically significant differences compared to the negative control ($p < 0.05$)

Рис. 5. Анализ влияния CBL0137 на экспрессию генов, вовлеченных в процессы пролиферации (а), апоптоза (б) и репарации (в). Результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени, нормированные на экспрессию гена RPLP0 и на отрицательный контроль (представлены в виде \log_2)
Fig. 5. Analysis of the effect of CBL0137 on expression of genes participating in proliferation (a), apoptosis (б) and repair (в). Results of real-time polymerase chain reaction normalized by RPLP0 gene expression and negative control (presented as \log_2)

максимально повышалась в 195 раз в клетках линии MCF7 и в 248 раз — в клетках линии SKBR3. При этом в клетках MDA-MB-231 при действии CBL не происходило изменений экспрессии гена *FOSL1*.

Влияние CBL на экспрессию генов апоптоза. Влияние CBL оценивали по изменению экспрессии проапоптотических (*BAX*, *FAS*, *BNIP3*) и антиапоптотических (*BCL2*, *BIRC3*, *BIRC5*, *BIRC6*, *XIAP*) генов. При действии CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в клетках MCF7 происходило увеличение экспрессии гена *BAX* в 3,6 и 5,3 раза соответственно, в клетках SKBR3 — в 4 и 5 раз соответственно (рис. 5, б). В клетках MDA-MB-231 зарегистрировано повышение его экспрессии в 2,9 раза только при действии 1 мкМ CBL. После обработки клеток 0,5 и 1 мкМ CBL показано увеличение экспрессии гена *FAS* в клетках MCF7 — в 13 и 28 раз соответственно, в клетках SKBR3 — в 17 и 25 раз соответственно, в клетках MDA-MB-231 — в 1,7 и 2,3 раза соответственно. Экспрессия гена *BNIP3* в клетках MCF7 и SKBR3 при обработке 1 мкМ CBL возрастала более чем в 2 раза. При этом в клетках MDA-MB-231 изменений экспрессии детектировано не было. В клетках MCF7 и SKBR3 при действии 0,5 мкМ CBL экспрессия гена *BCL2* снижалась более чем в 2 раза, при действии 1 мкМ CBL — более чем в 10 раз. В клетках MDA-MB-231 статистически значимого изменения экспрессии *BCL2* не наблюдалось. CBL в концентрациях 0,5 и 1 мкМ вызывал повышение экспрессии *BIRC3* в клетках MCF7 в 2,4 и 4 раза соответственно, в клетках SKBR3 — в 1,7 и 2,4 раза соответственно. Для MDA-MB-231 было выявлено дозозависимое повышение экспрессии гена *BIRC3* — в 1,3 и 4 раза соответственно.

Различные эффекты CBL также показаны для гена *BIRC5*. В клетках MCF7 его экспрессия снижалась более чем в 2,5 раза при действии обеих концентраций CBL, в клетках SKBR3 она не менялась, а для MDA-MB-231 продемонстрировано ее повышение более чем в 2 раза (при концентрации 1 мкМ). В клетках MCF7 и SKBR3 экспрессия гена *BIRC6* повышалась при действии обеих концентраций CBL более чем в 1,5 раза, в клетках MDA-MB-231 при действии 1 мкМ CBL — в 2,4 раза. Также детектировано повышение экспрессии гена *XIAP* более чем в 2 раза во всех клеточных линиях (в MCF7 — при действии обеих концентраций CBL, в SKBR3 и MDA-MB-231 — при действии 1 мкМ CBL).

Влияние CBL на экспрессию генов репарации. Для исследования выбраны гены *GADD45*, *XRCC1* и *XPC*, ассоциированные с эксцизионной репарацией оснований и нуклеотидов, *MLH1*, *MGMT* и *MSH2*, участвующие в мисматч-репарации, *BRCA1* и *BRCA2*, отвечающие за гомологичную рекомбинацию, а также ингибиторы контрольных точек клеточного цикла *ATR* и *MDC1*. При действии 0,5 и 1 мкМ экспрессия гена *GADD45* сильно возрастала в клетках MCF7 и SKBR3 — в 127 и 160 раз и в 98 и 265 раз соответственно (рис. 5, в). В клетках MDA-MB-231 повышение

экспрессии оказалось менее выражено: в 2,4 раза при обеих дозах CBL. Для клеток MCF7 и SKBR3 показано, что при действии обеих концентраций CBL экспрессия гена *XRCC1* возрастала более чем в 3,5 раза, а *XPC* — более чем в 13 раз. Для клеток MDA-MB-231 продемонстрирован статистически значимый рост количества мРНК генов *XRCC1* и *XPC*: в 1,5 раза при действии обеих концентраций CBL.

Конститутивный уровень экспрессии гена *MSH2* в клетках MCF7 и SKBR3 не детектировался. В клетках MDA-MB-231 мы наблюдали 2-кратное увеличение экспрессии гена *MSH2* при действии обеих доз CBL. Экспрессия гена *MLH1* не менялась в клетках MCF7 и SKBR3 и незначительно увеличивалась в клетках MDA-MB-231 при действии обеих концентраций CBL. Экспрессия гена *MGMT* оставалась неизменной после обработки всех клеточных линий. Действие CBL не вызывало статистически значимого изменения экспрессии *BRCA1* в клетках MCF7 и SKBR3, при этом в клетках MDA-MB-231 было зарегистрировано ее повышение более чем в 1,6 раза при обеих концентрациях CBL. Экспрессия *BRCA2* дифференциально менялась при действии CBL в клетках РМЖ. В клетках MCF7 происходило снижение экспрессии в 1,4 раза при действии 0,5 мкМ, при этом CBL в концентрации 1 мкМ вызывал увеличение экспрессии в 1,5 раза.

В клетках SKBR3 при действии обеих доз CBL количество мРНК уменьшалось в 2 раза. Экспрессия гена *BRCA2* в клетках MDA-MB-231 статистически значимо возрастала при обработке CBL — более чем в 1,4 раза. Конститутивная экспрессия гена *ATR* в линиях MCF7 и SKBR3 была недостаточна для детекции. В клетках MDA-MB-231 при действии 0,5 и 1 мкМ CBL экспрессия гена *ATR* возрастала более чем в 1,7 раза. В клетках MCF7 мы наблюдали увеличение экспрессии гена *ATM* более чем в 5 раз при действии обеих концентраций CBL. В клетках SKBR3 она возрастала в 3 раза при действии 0,5 мкМ CBL. Для MDA-MB-231 зарегистрировано повышение экспрессии *ATM* в 1,3 раза при действии 0,5 мкМ CBL и в 2,5 раза при действии 1 мкМ CBL. Экспрессия гена *MDC1* снижалась более чем в 1,5 раза в клетках MCF7 (при концентрации CBL 1 мкМ) и SKBR3 (при обеих концентрациях CBL). В клетках MDA-MB-231, напротив, наблюдалось увеличение экспрессии этого гена в 1,5 и 2 раза при действии 0,5 и 1 мкМ CBL соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время широко исследуется противоопухолевое действие CBL. В качестве ингибитора FACT он способствует снижению роста и жизнеспособности опухолевых клеток [24–27], а его влияние на такие сигнальные пути, как NOTCH, Hedgehog, NF- κ B, p53, и экспрессию *c-MYC* — преодолению резистентности или усилению действия противоопухолевых препаратов на моделях глиобластомы, медуллобластомы, мелко-

клеточного рака легкого, рака поджелудочной железы, В-клеточной неходжкинской лимфомы и серозной карциномы яичников [26, 28–33]. Показано, что CBL повышает эффективность лучевой терапии нейробластомы *in vivo* [29].

В данном исследовании мы изучили механизмы молекулярного действия CBL на клетки РМЖ различных молекулярных подтипов.

Ранее продемонстрированы цитотоксические эффекты CBL на клетках ЗНО различных нозологий, таких как рак яичников, колоректальный рак, лейкоз, множественная миелома и др. [21, 25, 33]. В нашем исследовании мы определили IC_{50} , IC_{30} и IC_{10} CBL для клеток РМЖ MCF7, MDA-MB-231 и SKBR3. Показано, что CBL ингибирует жизнеспособность клеток РМЖ в микромолярном диапазоне концентраций. При 24-часовом действии агента IC_{50} составили 14–25 мкМ, при 72-часовом – около 1 мкМ для всех клеточных линий. Чувствительность клеток РМЖ к CBL0137 была ранее исследована D. Fleishman и соавт. в контексте цитотоксичности в ответ на ингибирование FACT [34]. Для клеток MCF7 и SKBR3 отмечалась более высокая токсичность CBL, чем для клеток MDA-MB-231, несмотря на сравнимый уровень экспрессии FACT.

На клетках гематологических ЗНО и РМЖ, а также мышинных моделях медуллобластомы показано, что характерным влиянием CBL на клеточный цикл является G2/М-арест с последующими апоптотическими изменениями [25, 35, 36]. Однако в отношении В-клеточной неходжкинской лимфомы сообщалось о дозозависимом увеличении количества клеток в фазе S клеточного цикла, предположительно за счет влияния на путь с-MYC/p53/p21 [26], что также являлось причиной активации апоптоза. Полученные нами данные на клетках MCF7, SKBR3 и MDA-MB-231 показывают, что CBL вызывает арест в фазе G2/М в клетках РМЖ, и согласуются с продемонстрированным профилем действия CBL на другие ЗНО [28, 35]. Кроме того, во всех клеточных линиях мы наблюдали значительное повышение доли клеток с поздними апоптотическими изменениями, а в клетках MDA-MB-231 зарегистрировано увеличение числа клеток с ранним апоптозом. Вероятно, отсутствие значительного увеличения пика SubG1 при действии CBL связано с тем, что клетки РМЖ вступают в апоптоз не в фазе G1, а в фазе G2/М [37]. Это также может быть обусловлено тем, что CBL0137 активирует p53, который способствует транскрипции генов, благоприятствующих остановке G2/М (например, *14-3-3σ*, *Gadd45*), что провоцирует апоптоз [38].

При изучении влияния CBL на экспрессию генов пролиферации мы отметили сходный профиль экспрессии генов для клеток MCF7 и SKBR3.

Наблюдалось снижение экспрессии генов ранней фазы G1 *CDK4* и *CDK6*. Ингибирование их экспрессии, вероятно, происходит из-за продвижения по клеточному циклу, а также вследствие способности CBL

подавлять с-MYC и повышать активность p53 [19, 29]. Экспрессия генов циклинов D1, D2 и E1 (*CCND1*, *CCND2* и *CCNE1*), гена *PCNA* и активатора пролиферации *FOSL1*, напротив, возрастала при обработке CBL. Такой эффект был показан впервые. На модели лейкозов и колоректального рака, в свою очередь, наблюдалось снижение экспрессии ряда генов из этой группы [21, 25]. Для полного понимания механизма полученного эффекта необходимо провести дополнительные исследования. Однако сообщалось, что в клетках с амплификацией *TONSL*, таких как MCF7, чрезмерно представлены наборы генов, соответствующие мишеням транскрипционного фактора E2F, среди которых могут быть гены циклинов [39]. Накопление мРНК генов, кодирующих циклины, возможно, связано с тем, что взаимодействие CBL и FACT предотвращает участие FACT в репликации и способствует повреждению ДНК во время фазы S. Это приводит к замедлению роста и клеточной гибели [40].

Анализ профиля экспрессии генов, ассоциированных с фазой G2/М, подтвердил результаты FACS. Мы наблюдали снижение экспрессии генов *Ki-67*, *AURKA*, *AURKB*, влияющих на успешное прохождение фазы G2/М. Ингибирование *Ki-67* на уровне мРНК и белка при действии CBL показано для мышинных клеток медуллобластомы, а также на уровне белка в В-клеточной неходжкинской лимфоме [26, 36]. При обработке CBL клеток MDA-MB-231 мы наблюдали интегральное повышение экспрессии генов пролиферации, не приводящее к активному делению клеток. Возможно, такой эффект осуществлялся за счет повышения доступности хроматина при действии CBL [23, 41, 42].

Мы также оценили экспрессию генов, ассоциированных с апоптозом. Ранее показан проапоптотический эффект CBL в отношении серозной карциномы яичников, глиобластомы и гематологических ЗНО [25–27, 33]. В клетках MDA-MB-231 экспрессия большинства про- и антиапоптотических генов была равномерно повышена, как и в случае с генами пролиферации.

В клетках MCF7 и SKBR3 экспрессия проапоптотических генов *BAX*, *FAS* и *BNIP3* возрастала при действии CBL, что, вероятно, связано с активацией p53. Подобный эффект CBL для *BAX* на уровне белка продемонстрирован ранее на клетках гепатоцеллюлярной карциномы, рака яичника и В-клеточной неходжкинской лимфомы [26, 33, 43].

В отношении антиапоптотических генов мы наблюдали различные эффекты. Значительное подавление экспрессии при действии CBL показано для антагониста *BAX* – гена *BCL2*, что согласуется с вышеописанными результатами. Ингибирование экспрессии *BCL2* при действии CBL ранее выявлено для ряда клеточных линий лейкозов [25]. Также в клетках MCF7 при действии CBL была понижена экспрессия одного из генов семейства IAP – *BIRC5*, подавляемого p53, в то же время в клетках SKBR3 не отмечено изменения уровня его экспрессии. В литературе нет данных об уровне

экспрессии других членов данного семейства (*BIRC3*, *BIRC6*, *XIAP*) при действии CBL. Мы показали, что CBL повышает экспрессию данных генов в клетках РМЖ.

Мы выявили способность CBL повреждать ДНК в клетках РМЖ. Результаты теста ДНК-комет показали значимое повышение момента хвоста при действии 1 мкМ CBL во всех клеточных линиях и при действии 0,5 мкМ в клетках MDA-MB-231. Несмотря на увеличение степени повреждения ДНК, индекс момента хвоста после обработки клеток CBL не превышал 2, в то время как при действии положительного контроля медианное значение момента хвоста составляло 40 и более. Ранее сообщалось, что CBL не вызывает повреждения ДНК в человеческих и мышиных клетках [42, 44], за исключением клеток глиобластомы [32]. Вероятно, недостаточность систем репарации в клетках РМЖ при обработке CBL приводит к вторичному накоплению повреждений ДНК. Также возможны другие механизмы, обусловленные изменением структуры хроматина или aberrантной экспрессией генов и белков.

Кураксин CBL активно участвует в модуляции различных видов репарации. Так, субъединица комплекса FACT–SSRP1 играет большую роль в восстановлении повреждений ДНК посредством ремоделирования хроматина и взаимодействия с белками PARP и XRCC1. Кроме того, SSRP1 влияет на гомологичную рекомбинацию (homologous recombination, HR) через взаимодействие с ключевым регуляторным белком HR RAD54 [33]. В то же время ингибирование FACT с помощью CBL снижает ацетилирование белка APE1, эндонуклеазы, участвующей в эксцизионной репарации оснований ДНК (base excision repair, BER), что блокирует его функцию [36].

Ранее было показано, что CBL подавляет HR в клетках серозной карциномы яичников [33], а в клетках медуллобластомы препятствует эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) [36]. Также при действии CBL на клетки РМЖ выявлено изменение экспрессии пула генов, ассоциированных с HR [35].

Мы изучили влияние CBL на экспрессию генов, кодирующих белки репарации в клетках MCF7 и SKBR3, и MDA-MB-231, однако в MDA-MB-231 снова наблюдали интегральное повышение уровня экспрессии генов. Для MCF7 и SKBR3 показано сни-

жение экспрессии гена *BRCA2*, но не *BRCA1*, что в целом может свидетельствовать о подавлении HR аналогично действию CBL на другие ЗНО. Повышение экспрессии генов эксцизионной репарации оснований *XRCC1* и *XPC*, вероятнее всего, ассоциировано с влиянием p53. Кроме того, мы наблюдали значительное повышение экспрессии p53-активируемого гена *GADD45*, ассоциированного с BER и NER, но также способного вызывать G2/M-арест через воздействие на CDC2/CCNB1 и ингибирование киназной активности Auroga-A [45, 46]. Однако экспрессия гена *MDC1*, активатора контрольных точек фаз S и G2/M, индуцируемая повреждением ДНК, снижалась, что, возможно, объясняется подавлением c-MYC при действии CBL. Экспрессия *ATM* – другого гена-активатора контрольных точек – напротив, возрастала, что говорит о повреждении ДНК и возможном аресте клеточного цикла как в фазе G1/S, так и в G2/M. В то же время CBL не влиял на экспрессию генов, ассоциированных с mismatch-репарацией, что было показано впервые. Стоит отметить, что в ряде работ сообщалось о влиянии CBL на клетки через изменение структуры хроматина, без непосредственного повреждения ДНК [41, 42, 44]. Вероятно, способность CBL инициировать разрывы ДНК и влиять на экспрессию генов репарации зависит от типа клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках представленного исследования показано противоопухолевое действие CBL на клетки РМЖ *in vitro*. Кураксин CBL оказывает цитотоксический эффект, вызывает повреждение ДНК, а также запускает G2/M-арест и апоптоз в клетках РМЖ. Влияние CBL на экспрессию генов, ассоциированных с ключевыми процессами опухолевого роста, различается. Интегральное повышение экспрессии генов при действии CBL на клетки MDA-MB-231 показано впервые и является предметом для дальнейших исследований. Изучение влияния CBL на экспрессию генов в MCF7 и SKBR3 позволяет лучше понять, какие сигнальные пути он задействует, что дает возможность оценивать его перспективность как для монотерапии, так и для комбинации с другими агентами в целях усиления противоопухолевого эффекта или преодоления резистентности к терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Baylin S.B., Jones P.A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8(9):a019505. DOI: 10.1101/cshperspect.a019505
- Prabhu K.S., Sadida H.Q., Kuttikrishnan S. et al. Beyond genetics: Exploring the role of epigenetic alterations in breast cancer. *Pathol Res Pract* 2024;254:155174. DOI: 10.1016/j.prp.2024.155174
- Thakur C., Qiu Y., Fu Y. et al. Epigenetics and environment in breast cancer: new paradigms for anti-cancer therapies. *Front Oncol* 2022;12:971288. DOI: 10.3389/fonc.2022.971288
- Judes G., Dubois L., Rifai K. et al. TIP60: an actor in acetylation of H3K4 and tumor development in breast cancer. *Epigenomics* 2018;10(11):1415–30. DOI: 10.2217/epi-2018-0004
- Paydar P., Asadikaram G., Nejad H.Z. et al. Epigenetic modulation of BRCA-1 and MGMT genes, and histones H4 and H3 are associated with breast tumors. *J Cell Biochem* 2019;120(8):13726–36. DOI: 10.1002/jcb.28645
- Muller B.M., Jana L., Kasajima A. et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer—over expression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* 2013;13:215. DOI: 10.1186/1471-2407-13-215
- Rifai K., Judes G., Idrissou M. et al. SIRT1-dependent epigenetic regulation of H3 and H4 histone acetylation in human breast cancer. *Oncotarget* 2018;9(55):30661–78. DOI: 10.18632/oncotarget.25771
- Aljada A., Saleh A.M., Alkathiri M. et al. Altered sirtuin 7 expression is associated with early stage breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 2015;9:3–8. DOI: 10.4137/BCBCR.S23156
- Pfister S., Rea S., Taipale M. et al. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. *Int J Cancer* 2008;122(6):1207–13. DOI: 10.1002/ijc.23283
- Wang D., Yang P.N., Chen J. et al. Promoter hypermethylation may be an important mechanism of the transcriptional inactivation of ARRDC3, GATA5, and ELP3 in invasive ductal breast carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2014;396(1–2):67–77. DOI: 10.1007/s11010-014-2143-y
- Xiao X.S., Cai M.Y., Chen J.W. et al. High expression of p300 in human breast cancer correlates with tumor recurrence and predicts adverse prognosis. *Chin J Cancer Res* 2011;23(3):201–7. DOI: 10.1007/s11670-011-0201-5
- Sahni J.M., Keri R.A. Targeting bromodomain and extraterminal proteins in breast cancer. *Pharmacol Res* 2018;129:156–76. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.11.015
- Wu S.Y., Lee C.F., Lai H.T. et al. Opposing functions of BRD4 isoforms in breast cancer. *Mol Cell* 2020;78(6):1114–32:e10. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.034
- Perez-Pena J., Paez R., Nieto-Jimenez C. et al. Mapping Bromodomains in breast cancer and association with clinical outcome. *Sci Rep* 2019;9(1):5734. DOI: 10.1038/s41598-019-41934-3
- Zheng Z.Z., Xia L., Hu G.S. et al. Super-enhancer-controlled positive feedback loop BRD4/ERalpha-RET-ERalpha promotes ERalpha-positive breast cancer. *Nucleic Acids Res* 2022;50(18):10230–48. DOI: 10.1093/nar/gkac778
- Murakami S., Li R., Nagari A. et al. Distinct roles for BET family members in estrogen receptor alpha enhancer function and gene regulation in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2019;17(12):2356–68. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0393
- Andrikopoulou A., Liontos M., Koutsoukos K. et al. The emerging role of BET inhibitors in breast cancer. *Breast* 2020;53:152–63. DOI: 10.1016/j.breast.2020.08.005
- Ren L., Yang Y., Li W. et al. Recent advances in epigenetic anticancer therapeutics and future perspectives. *Front Genet* 2022;13:1085391. DOI: 10.3389/fgene.2022.1085391
- Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purmal A.A. et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra74. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002530
- Kantidze O.L., Luzhin A.V., Nizovtseva E.V. et al. The anti-cancer drugs curaxins target spatial genome organization. *Nat Commun* 2019;10(1):1441. DOI: 10.1038/s41467-019-09500-7
- Kirsanov K., Fetisov T., Lesovaya E.A. et al. Prevention of colorectal carcinogenesis by dna-binding small-molecule curaxin CBL0137 involves suppression of wnt signaling. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020;13(1):53–64. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0198
- Leonova K., Safina A., Neshet E. et al. TRAIN (transcription of repeats activates interferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells. *Elife* 2018;7:e.30842. DOI: 10.7554/eLife.30842
- Maksimova V., Popova V., Prus A. et al. Insights into the mechanism of curaxin CBL0137 epigenetic activity: the induction of DNA demethylation and the suppression of BET family proteins. *Int J Mol Sci* 2023;24(16):12874. DOI: 10.3390/ijms241612874
- Jin M.Z., Xia B.R., Xu Y., Jin W.L. Curaxin CBL0137 exerts anticancer activity via diverse mechanisms. *Front Oncol* 2018;8:598. DOI: 10.3389/fonc.2018.00598
- Fetisov T.I., Borunova A.A., Antipova A.S. et al. Targeting features of curaxin CBL0137 on hematological malignancies *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicines* 2023;11(1):230. DOI: 10.3390/biomedicines11010230
- Lv Y., Du Y., Li K. et al. The FACT-targeted drug CBL0137 enhances the effects of rituximab to inhibit B-cell non-Hodgkin's lymphoma tumor growth by promoting apoptosis and autophagy. *Cell Commun Signal* 2023;21(1):16. DOI: 10.1186/s12964-022-01031-x
- Barone T.A., Burkhart C.A., Safina A. et al. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and resistant glioblastoma. *Neuro Oncol* 2017;19(2):186–96. DOI: 10.1093/neuonc/now141
- Mo J., Liu F., Sun X. et al. Inhibition of the FACT complex targets aberrant hedgehog signaling and overcomes resistance to smoothed antagonists. *Cancer Res* 2021;81(11):3105–20. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3186
- Carter D.R., Murray J., Cheung B.B. et al. Therapeutic targeting of the MYC signal by inhibition of histone chaperone FACT in neuroblastoma. *Sci Transl Med* 2015;7(312):312ra176. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab1803
- De S., Lindner D.J., Coleman C.J. et al. The FACT inhibitor CBL0137 synergizes with cisplatin in small-cell lung cancer by increasing NOTCH1 expression and targeting tumor-initiating cells. *Cancer Res* 2018;78(9):2396–406. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1920
- Burkhart C., Fleishman D., Kohn R. et al. Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. *Oncotarget* 2014;5(22):11038–53. DOI: 10.18632/oncotarget.2701
- Tallman M.M., Zalenski A.A., Deighen A.M. et al. The small molecule drug CBL0137 increases the level of DNA damage and the efficacy of radiotherapy for glioblastoma. *Cancer Lett* 2021;499:232–42. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.11.027
- Lu X., He Y., Johnston R.L. et al. CBL0137 impairs homologous recombination repair and sensitizes high-grade serous ovarian carcinoma to PARP inhibitors. *J Exp Clin Cancer Res* 2022;41(1):355. DOI: 10.1186/s13046-022-02570-4
- Fleishman D., Prendergast L., Safina A. et al. Level of FACT defines the transcriptional landscape and aggressive phenotype of breast cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(13):20525–42. DOI: 10.18632/oncotarget.15656

35. Khatpe A.S., Dirks R., Bhat-Nakshatri P. et al. TONSL Is an immortalizing oncogene and a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 2023;83(8):1345–60. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-3667
36. Song H., Xi S., Chen Y. et al. Histone chaperone FACT complex inhibitor CBL0137 interferes with DNA damage repair and enhances sensitivity of medulloblastoma to chemotherapy and radiation. *Cancer Lett* 2021;520:201–12. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.07.020
37. Plesca D., Mazumder S., Almasan A. DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol* 2008;446:107–22. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01606-6
38. Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A., Palladino M.A. *Concepts of genetics*. 10 edn. Pearson, 2011.
39. Espinoza J.A., Kanellis D.C., Saproo S. et al. Chromatin damage generated by DNA intercalators leads to degradation of RNA Polymerase II. *Nucleic Acids Res* 2024;52(8):4151–66. DOI: 10.1093/nar/gkac069
40. Prendergast L., Hong E., Safina A. et al. Histone chaperone FACT is essential to overcome replication stress in mammalian cells. *Oncogene* 2020;39(28):5124–37. DOI: 10.1038/s41388-020-1346-9
41. Volokh O.I., Sivkina A.L., Moiseenko A.V. et al. Mechanism of curaxin-dependent nucleosome unfolding by FACT. *Front Mol Biosci* 2022;9:1048117. DOI: 10.3389/fmolb.2022.1048117
42. Neshet E., Safina A., Aljahdali I. et al. Role of Chromatin damage and chromatin trapping of FACT in mediating the anticancer cytotoxicity of DNA-binding small-molecule drugs. *Cancer Res* 2018;78(6):1431–43. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2690
43. Albahde M.A.H., Zhang P., Chen H., Wang W. CBL0137 administration suppresses human hepatocellular carcinoma cells proliferation and induces apoptosis associated with multiple cell death related proteins. *Neoplasma* 2020;67(3):547–56. DOI: 10.4149/neo_2020_190621N535
44. Luzhin A., Rajan P., Safina A. et al. Comparison of cell response to chromatin and DNA damage. *Nucleic Acids Res* 2023;51(21):11836–55. DOI: 10.1093/nar/gkad865
45. Salvador J.M., Brown-Clay J.D., Fornace A.J. Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2013;793:1–19. DOI: 10.1007/978-1-4614-8289-5_1
46. Shao S., Wang Y., Jin S. et al. Gadd45a interacts with aurora-A and inhibits its kinase activity. *J Biol Chem* 2006;281(39):28943–50. DOI: 10.1074/jbc.M600235200

Вклад авторов

В.Г. Попова, Е.С. Лылова: получение и анализ данных, написание текста статьи, подготовка иллюстраций (внесли равный вклад);
 А.Ю. Букина, К.А. Зимин, М.К. Хирин, Е.М. Жидкова, Е.С. Трапезникова: получение данных для анализа;
 М.Г. Якубовская: анализ полученных данных, редактирование;
 В.П. Максимова, К.И. Кирсанов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, подготовка иллюстраций, редактирование (внесли равный вклад).

Authors' contributions

V.G. Popova, E.S. Lylova: obtaining and analyzing data, article writing, preparing illustrations (made an equal contributions);
 A.Yu. Bukina, K.A. Zimin, M.K. Khirin, E.M. Zhidkova, E.S. Trapeznikova: obtaining data for analysis;
 M.G. Yakubovskaya: analysis of the received data, editing;
 V.P. Maksimova, K.I. Kirsanov: research design development, data analysis, illustration preparation, editing (made an equal contributions).

ORCID авторов / ORCID authors

В.Г. Попова / V.G. Popova: <https://orcid.org/0000-0002-7301-605X>
 Л.С. Лылова / E.S. Lylova: <https://orcid.org/0000-0001-6388-1624>
 А.Ю. Букина / A.Yu. Bukina: <https://orcid.org/0000-0002-0963-3432>
 К.А. Зимин / K.A. Zimin: <https://orcid.org/0009-0008-7714-114X>
 М.К. Хирин / M.K. Khirin: <https://orcid.org/0009-0008-1533-5184>
 Е.М. Жидкова / E.M. Zhidkova: <https://orcid.org/0000-0003-3318-9391>
 Е.С. Трапезникова / E.S. Trapeznikova: <https://orcid.org/0000-0003-1274-4667>
 М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
 В.П. Максимова / V.P. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-0896-2952>
 К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10163).

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10163).

Статья поступила: 13.05.2024. **Принята к публикации:** 01.11.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

Article submitted: 13.05.2024. **Accepted for publication:** 01.11.2024. **Published online:** 11.12.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-80-92>

Изменения экспрессии генов-регуляторов апоптоза как фактор развития химиорезистентности сарком мягких тканей

Т.И. Фетисов¹, С.А. Хазанова¹, П.А. Штомпель¹, Е.С. Трапезникова¹, А.А. Тарарыкова¹, В.Ю. Зиновьева¹, В.И. Маршалл¹, А.А. Ловенгер¹, И.С. Купаева¹, Д.В. Рогожин¹, А.Ю. Бохян¹, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,2}

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

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

Контакты: Тимур Игоревич Фетисов TimkaTryam@yandex.ru

Введение. Активное использование высокотоксичной химиотерапии в лечении сарком мягких тканей определяет необходимость поиска критериев и маркеров хеморезистентности пациентов к проводимой терапии.

Цель исследования – изучение взаимосвязи резистентности опухолевых клеток к химиотерапии и уровня экспрессии белков-регуляторов апоптоза (PUMA, PMAIP-1, PIDD-1, AIFM-2, Вах, GADD45а) в первичных культурах сарком мягких тканей.

Материалы и методы. Для получения первичных культур сарком мягких тканей использовалось ферментативное выделение, для определения клеточной гибели – резазуриновый тест. Экспрессия генов оценена с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени, количество белка – методом иммуноблоттинга.

Результаты. Получены 73 первичные культуры сарком мягких тканей, для которых с помощью резазуринового теста на цитотоксичность определена хемочувствительность к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину, пазопанибу и их комбинациям. Обнаружены положительные связи экспрессии гена *AIFM-2* с резистентностью к пазопанибу, доксорубину и его комбинации с ифосфамидом в липосаркомах, синовиальных и недифференцированных плеоморфных саркомах. Кроме того, выявлена ассоциация экспрессии генов *Вах*, *PUMA*, *PMAIP-1*, *GADD45а* и *PIDD-1* с резистентностью к исследуемым препаратам в различных нозологических подгруппах сарком. Результаты исследования количества белка показали, что недифференцированные плеоморфные и синовиальные саркомы с низким содержанием GADD45а наиболее резистентны к исследуемым препаратам. Липосаркомы с высокой экспрессией Вах чувствительнее к доцетакселу и гемцитабину, в то время как синовиальные саркомы с высокой экспрессией Вах – к доксорубину и ифосфамиду, но не к доцетакселу и гемцитабину.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи активности исследуемых генов-регуляторов апоптоза и резистентности к препаратам, применяемым в терапии сарком мягких тканей.

Ключевые слова: саркома мягких тканей, химиотерапия, апоптоз, хеморезистентность, прогноз индивидуальной чувствительности и развития лекарственной резистентности

Для цитирования: Фетисов Т.И., Хазанова С.А., Штомпель П.А. и др. Изменения экспрессии генов-регуляторов апоптоза как фактор развития химиорезистентности сарком мягких тканей. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):80–92.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-80-92>

Changes in the expression of genes that regulate apoptosis as a factor in the development of chemoresistance in soft tissue sarcoma

T.I. Fetisov¹, S.A. Khazanova¹, P.A. Shtompel¹, E.S. Trapeznikova¹, A.A. Tararykova², V.Yu. Zinovyeva¹, V.I. Marshall¹, A.A. Lowenger¹, I.S. Kupaeva¹, D.V. Rogozhin¹, A.Yu. Bokhyan¹, G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya¹, K.I. Kirsanov^{1,2}

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

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Timur Igorevich Fetisov TimkaTryam@yandex.ru

Introduction. The active use of highly toxic chemotherapy in the treatment of soft tissue sarcomas determines the need to search for criteria and markers of chemoresistance of patients to the therapy.

Aim. To study the connection between tumor cell resistance to chemotherapy and expression levels of apoptosis-regulating proteins (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *AIFM-2*, *Bax*, *GADD45a*) in primary cultures of soft tissue sarcomas.

Materials and methods. Primary cultures of soft tissue sarcomas were obtained using enzymatic digestion, cell death was evaluated using resazurine assay. Gene expression was measured using real-time polymerase chain reaction, protein levels using immunoblotting assay.

Results. 73 primary cultures of soft tissue sarcomas were obtained, for which chemosensitivity to doxorubicin, ifosfamide, docetaxel, gemcitabine, pazopanib and their combinations was determined using a resazurin cytotoxicity test. Associations of *AIFM-2* gene expression with resistance to pazopanib, doxorubicin and its combination with ifosfamide were found in liposarcoma, synovial and undifferentiated pleomorphic sarcomas. In addition, associations between the expression of the *Bax*, *PUMA*, *PMAIP-1*, *GADD45a* and *PIDD-1* genes and resistance to the studied drugs in various nosological subgroups of sarcomas were identified. When studying the amount of protein, it was revealed that undifferentiated pleomorphic and synovial sarcomas with a low content of *GADD45a* are more resistant to the studied drugs. Liposarcomas with high *Bax* expression are more resistant to docetaxel and gemcitabine, while synovial sarcomas with high *Bax* expression are more sensitive to doxorubicin and ifosfamide.

Conclusion. The data obtained indicate a relationship between the activity of the studied genes-regulators of apoptosis and resistance to drugs used in the treatment of soft tissue sarcomas.

Keywords: soft tissue sarcoma, chemotherapy, apoptosis, chemoresistance, prognosis of individual sensitivity and development of drug resistance

For citation: Fetisov T.I., Khazanova S.A., Shtompel P.A. et al. Changes in the expression of genes that regulate apoptosis as a factor in the development of chemoresistance in soft tissue sarcoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):80–92. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-80-92>

ВВЕДЕНИЕ

Саркомы мягких тканей (СМТ) – гетерогенная группа злокачественных новообразований. По частоте возникновения данная патология занимает 5-е место среди всех онкологических заболеваний [1]. Эта группа опухолей включает более 70 гистологических подтипов, развивающихся из клеток-предшественниц жировой, мышечной и мезенхимальной тканей [2]. Широкое иссечение опухоли является основным методом лечения СМТ, однако опухоли высокой степени злокачественности требуют многокомпонентной терапии, которая включает хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию (ХТ) [3].

Несмотря на значительное расширение спектра химиотерапевтических/таргетных препаратов, применяемых в онкологической практике в последние годы, ХТ СМТ не претерпела особых изменений и в основном включает классические химиопрепараты, используемые чаще всего при высокозлокачественных опухолях [3]. Развитие резистентности к этим лекарственным средствам является основной причиной неэффективности лечения и быстрого рецидивирования СМТ.

В настоящее время выделен ряд механизмов, способствующих развитию лекарственной устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, включая нарушение метаболизма лекарственных средств, изменение свойств цитоплазматической мембраны, активацию выброса лекарственного средства

из клетки, дерегуляцию процессов репарации ДНК, приобретение опухолевыми клетками свойств стволовых клеток и ингибирование путей гибели [4]. Dereгуляция путей апоптоза является одной из ключевых характеристик опухолевых клеток [5], а снижение его активности тесно связано с возникновением резистентности [3]. Ранее для СМТ была продемонстрирована связь наличия мутаций в р53-зависимом пути активации апоптоза с развитием резистентности к ХТ [6]. Однако СМТ не относятся к опухолям с высокой мутационной нагрузкой, частота встречаемости мутаций в р53-зависимом пути активации апоптоза относительно низкая [6, 7]. Тем не менее для этих новообразований характерны значительные эпигенетические перестройки, приводящие к изменению активности генов, вовлеченных в канцерогенез, и развитие резистентности к ХТ.

Данное исследование сфокусировано на оценке экспрессии ряда генов р53-зависимого пути активации апоптоза (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в клетках СМТ с различным уровнем резистентности. Белки, кодируемые генами *Bax*, *PUMA*, *PMAIP-1* и *GADD45a*, являются положительными регуляторами митохондриального пути апоптоза [8], белок, кодируемый геном *PIDD-1*, взаимодействует с каспазой 2, что приводит к активации апоптоза [9], белок, кодируемый геном *AIFM-2*, осуществляет Вах-независимую активацию апоптоза [10]. Ранее была продемонстрирована связь активности этих генов

с развитием резистентности к ХТ при различных формах опухолей [11–13]. Для некоторых из них выявлено изменение экспрессии при СМТ [14, 15].

Цель исследования – изучение взаимосвязи уровня резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам и уровней экспрессии генов р53-зависимой активации апоптоза ((*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в переживающих культурах СМТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опухолевые образцы. Все процедуры проводились в соответствии с Международным кодексом медицинской этики Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association). С ноября 2022 г. по март 2024 г. из хирургического отделения Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина получено 73 образца СМТ. В исследование вошли образцы СМТ, подтвержденные гистологически.

Применяемые препараты. В исследовании использовали доксорубин (Докс) (РОНЦ, Россия), доцетаксел (Доц) (ООО «Натива», Россия) и гемцитабин (Гем) (Biocad, Россия). Поскольку ифосфамид (Ифо) является пролекарством и требует активации в печени *in vivo*, был использован его активный метаболит – 4-гидроперокси-ифосфамид (4-ОН-Ифо) (Niomech, Германия).

Измерение хемочувствительности. Тест на определение хемочувствительности проводили непосредственно после получения опухолевого образца. Образцы забирали во время операции и с помощью скальпеля разделяли на фрагменты (1 мм³), которые затем диссоциировали путем инкубации в 5–10 мл стерильной смеси коллагеназ в течение 2–3 ч при 37 °С на шейкере для приготовления суспензии одиночных клеток. После доведения клеточной суспензии до концентрации 1–2 × 10⁵ клеток/мл в каждую лунку 96-луночного микропланшета добавляли по 100 мкл суспензии клеток. Отдельные агенты протестированы при 6 различных стандартных концентрациях лекарственных средств, в частности, в 6,25; 12,5; 25; 50; 100 и 200 % пиковой концентрации лекарственного средства в плазме, как было предложено Р.Е. Andreotti и соавт. [16] (табл. 1).

Планшеты инкубировали в течение 6 дней при стандартных условиях (температура – 37 °С, влажность – 95 %, концентрация CO₂ – 5 %). Жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа на основе резазурина, как описано ранее [17]. Результаты теста интерпретировали с использованием индекса резистентности (ИР), рассчитываемого по формуле: ИР = 600 – сумма % ингибирования при 200, 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 % стандартных концентрациях лекарственных средств [16].

Выделение РНК и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией. Тотальную РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Для синтеза комплементарной ДНК использовали набор реагентов для

Таблица 1. Испытываемые препараты и их 100 % стандартные концентрации, использованные в тестах *in vitro*

Table 1. Studied pharmaceuticals and their 100 % standard concentrations using in *in vitro* assays

Препарат/комбинация Pharmaceutical/combination	100 % стандартная концентрация, мг/мл 100 % standard concentration, mg/mL
Доксорубин Doxorubicin	3,0
Ифосфамид (4-hydroxy-ифосфамид) Ifosfamide (4-hydroxy-ifosfamide)	3,0
Доксорубин + ифосфамид Doxorubicin + ifosfamide	3,0 + 3,0
Доцетаксел Docetaxel	11,3
Гемцитабин Gemcitabine	25,0
Доцетаксел + гемцитабин Docetaxel + gemcitabine	11,3 + 25,0
Пазопаниб Pazopanib	3,2

обратной транскрипции MMLV RT kit («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с помощью интеркалирующего флуоресцентного агента SYBR Green I («Евроген», Россия) и ДНК-полимеразы Taq («Евроген», Россия) на приборе CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Программа амплификации: 95 °С, 3 мин (95 °С – 10 с, 60 °С – 10 с, 72 °С – 30 с) – 39 циклов, кривая плавления – 65–95 °С. Последовательности праймеров выбраны в PrimerBank. Результаты нормализовали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства *RPLP0*. Использованные пары праймеров представлены в табл. 2.

Вестерн-блоттинг. Выделение общей фракции белка проводили лизис-буфером RIPA, инкубировали 40 мин с постоянным перемешиванием при 4 °С, затем центрифугировали (5 мин, 1500 об/мин, 20 °С). Вертикальный электрофорез проводили в 10 % полиакриламидном геле, для разделения использовали трис-глициновый буфер с добавлением додецилсульфата натрия (1 %). Форез выполняли в течение 30 мин при комнатной температуре и напряжении 60 В, затем 20 мин при 80 В, после чего напряжение увеличивали до 100 В – до тех пор, пока 3 нижних маркерных белка не разошлись на 5 мм друг от друга.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0,22 мкм, Bio-Rad, США) выполняли при 100 В в течение 1 ч во льду – в трис-глициновом растворе. Контроль переноса осуществляли с помощью раствора

Таблица 2. *Использованные пары праймеров*Table 2. *Primer pairs used*

Ген Gene	Последовательность праймера Primer sequence
<i>GADD45</i>	hGADD45_F: GAGAGCAGAAGACCGAAAGGA hGADD45_R: CACAACACCACGTTATCGGG
<i>BAX</i>	hBAX_F: TCATGGGCTGGACATTGGAC hBAX_R: GCGTCCCAAAGTAGGAGAGG
<i>PUMA</i>	hPUMA_F: GACGACCTCAACGCACAGTA hPUMA_R: TAATTGGGCTCCATCTCGGG
<i>PMAIP-1</i>	hPMAIP1_F: CCAGCCGCCAGTCTAATCA hPMAIP1_R: GTGCCCTTGGAAACGGAAGA
<i>PIDD-1</i>	hPIDD-1_F: CCATCCCTGCCAATATCCCG hPIDD-1_R: CGTCCGAATCCTCTGAAGCA
<i>AIFM-2</i>	hAIFM2_F: AGACAGGGTTTCGCCAAAAGA hAIFM2_R: CAGGTCTATCCCCACTACTAGC
<i>RPLP0</i>	RPLP0_F: CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCAATCA RPLP0_R: CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC

красителя Ponceau. Мембраны блокировали в растворе обезжиренного сухого молока в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего проводили гибридизацию первичными антителами ABclonal PUMA, PMAIP-1, PIDD-1, BAX, AIFM-2, GADD45a и контрольными антителами к актину в течение 16 ч при 4 °С.

Нормирование результатов выполняли с помощью иммуноблоттинга с антителами к β-актину. Для детекции белков использовали проявляющий реагент Clarity™ Western ECL Substrate и систему цифровой обработки изображений ImageQuant LAS 500. Денситометрический анализ проводили в программе ImageJ Fiji (National Institutes of Health, США).

Статистический анализ. Анализ различий между группами проведен с помощью расчета U-критерия Манна–Уитни. Для количественной оценки степени корреляции между параметрами рассчитан коэффициент корреляции Спирмена. Для анализа групп с различными типами гистологии использовали критерий Краскала–Уоллиса. Все расчеты проведены в GraphPad Prism 6.0 (США). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (двусторонний критерий).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика пациентов, вошедших в исследование. Получены 73 образца от пациентов с СМТ. Средний возраст больных составил 52 года (диапазон 19–87 лет). В выборке незначительно преобладали пациенты женского пола (43 (59 %) случая). У 39 (53 %) больных диагноз установлен впервые. Наиболее частой локализацией СМТ были конечности (49 (66 %) случаев). В основном встречались опухоли нижних конечностей (30 (61 %) случаев). Наиболее распространенными

в нашей выборке оказались липосаркомы (ЛПС) (13 (18 %) случаев), чаще всего дедифференцированного типа (6 (46 %) случаев). Преобладали СМТ G₃ (55 (75 %) случаев).

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 3.

Для каждого выделенного образца проведен анализ химиорезистентности к Докс, Ифо, Гем, Доц и их комбинациям, а также к пазопанибу (Пазо). Полученные опухолевые культуры были более устойчивы к Ифо, Гем и Пазо. Комбинации Докс + Ифо и Доц + Гем оказались эффективнее препаратов, используемых в монорежиме. При этом не наблюдалось статистически значимой разницы между резистентностью клеток к каждой из комбинаций. Резистентны к обоим комбинациям оказались 36 % протестированных культур, в то время как 23 % были чувствительны к ним. Полученные в тесте ИР_{Докс} и ИР_{Ифо} положительно коррелировали между собой и сильно коррелировали с ИР_{Доц + Ифо} ($r = 0,31$; $r = 0,86$ и $r = 0,52$ соответственно; $p < 0,001$). ИР_{Доц} и ИР_{Гем} не коррелировали друг с другом и умеренно коррелировали с ИР_{Доц + Гем} ($r = 0,78$ и $r = 0,47$ соответственно; $p < 0,0001$). Кроме того, ИР_{Доц + Гем} и ИР_{Докс + Ифо} положительно коррелировали друг с другом ($r = 0,39$; $p < 0,001$), а ИР_{Пазо} – с ИР_{Ифо}, ИР_{Докс + Ифо} и ИР_{Гем} ($r = 0,53$; $r = 0,25$ и $r = 0,32$ соответственно; $p < 0,01$).

Анализ экспрессии генов, р53-зависимой активации апоптоза в исследуемой группе сарком мягких тканей. В образцах СМТ выявлена наиболее высокая экспрессия генов *PUMA*, *Bax* и *GADD45a* (рис. 1). Результаты исследования взаимосвязи экспрессии генов р53-зависимой активации апоптоза (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в 62 переживающих культурах СМТ

Таблица 3. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Table 3. Characteristics of the patients included in the study

Показатель Parameter	Абс. (%) Abs. (%)
Пол: Sex:	
женский female	43 (59)
мужской male	30 (41)
Возраст, лет: Age, years:	
<40	17 (23)
>40	56 (77)
Степень злокачественности: Malignancy grade:	
G ₁₋₂	18 (25)
G ₃	55 (75)
Локализация опухоли: Tumor location:	
конечности limbs	49 (66)
туловище trunk	14 (19)
забрюшинное пространство retroperitoneal space	9 (12)
другие органы other organs	2 (3)
Вид опухоли: Tumor type:	
впервые выявленная primary	39 (53)
рецидив recurrent	34 (47)
Химиотерапия: Chemotherapy:	
не проводилась was performed	43 (58)
проводилась was not performed	30 (42)
Гистологический тип опухоли: Histological type of the tumor:	
липосаркома liposarcoma	13 (18)
синовиальная саркома synovial sarcoma	12 (16)
миксофибросаркома myxofibrosarcoma	12 (16)
лейомиосаркома leiomyosarcoma	10 (14)
недифференцированная плеоморфная саркома undifferentiated pleiomorphic sarcoma	8 (11)
другой other	18 (25)

продемонстрировали, что уровни экспрессии генов *PUMA*, *PIDD-1*, *Vax*, *PIDD-1*, *AIFM-2* и *PMAIP-1* положительно коррелируют друг с другом (табл. 4).

Далее проведен анализ уровней экспрессии РНК апоптоз-ассоциированных генов в различных гистологических типах СМТ: ЛПС, синовиальных саркомах (СС), миксофибросаркомах (МФС), недифференцированных плеоморфных саркомах (НПС) и лейомиосаркомах (ЛМС). Статистически значимой разницы в экспрессии исследуемых генов между различными гистологическими типами СМТ выявлено не было, однако на уровне тенденции ЛМС характеризовались более высоким уровнем экспрессии исследуемых генов, а СС – более низким (рис. 2).

Далее проведен корреляционный анализ связи между уровнями экспрессии генов активации апоптоза и ИР, полученными при тестировании *in vitro*. Для всех СМТ выявлена положительная корреляция средней силы уровня экспрессии гена *PIDD-1* с ИР_{Пазо} ($r = 0,35$; $p = 0,009$), а также слабая положительная корреляция между уровнями экспрессии *Vax* и ИР_{Доц} ($r = 0,32$; $p = 0,043$).

В ходе анализа корреляционных связей между экспрессией генов и ИР к препаратам в различных подгруппах СМТ получены следующие результаты.

Липосаркомы (12 образцов). Выявлена сильная корреляция уровня экспрессии *PMAIP-1* с ИР_{Ифо} ($r = -0,66$; $p = 0,044$), а в образцах ЛПС G₂ и G₃ ($n = 8$) продемонстрирована сильная положительная корреляция между уровнем экспрессии *AIFM-2* и ИР_{Докс + Ифо} ($r = 0,68$; $p = 0,044$), а также между уровнями экспрессии генов *AIFM-2*, *GADD45a* и ИР_{Пазо} ($r = 0,76$ и $r = 0,79$ соответственно; $p = 0,04$ и $p = 0,02$ соответственно).

Синовиальные саркомы (8 образцов). Установлена сильная положительная корреляция между уровнями экспрессии генов *AIFM-2* и *PIDD-1* и ИР_{Пазо} ($r = 0,91$ и $r = 0,73$ соответственно; $p = 0,005$ и $p = 0,04$ соответственно).

Миксофибросаркомы (10 образцов). Уровень экспрессии гена *Vax* коррелировал с ИР_{Докс} и ИР_{Доц} ($r = 0,68$ и $r = 0,7$ соответственно; $p = 0,05$ и $p = 0,043$ соответственно), уровень экспрессии *GADD45a* – с ИР_{Гем} ($r = -0,88$; $p = 0,003$), а уровень экспрессии *PIDD-1* – с ИР_{Доц} и ИР_{Доц + Гем} ($r = 0,85$ и $r = 0,78$ соответственно; $p = 0,006$ и $p = 0,017$ соответственно).

Недифференцированные плеоморфные саркомы (8 образцов). Выявлена сильная положительная корреляция между уровнем экспрессии гена *PUMA* и ИР_{Доц} и ИР_{Доц + Гем} ($r = 0,83$ и $r = 0,71$ соответственно; $p = 0,015$ и $p = 0,048$ соответственно), а также между уровнем экспрессии *PIDD-1* и ИР_{Доц + Гем} и ИР_{Ифо} ($r = 0,58$ и $r = 0,79$ соответственно; $p = 0,015$ и $p = 0,028$ соответственно). Уровень экспрессии гена *AIFM-2* отрицательно коррелировал с ИР_{Докс} ($r = -0,81$; $p = 0,022$), а уровень экспрессии *Vax* положительно коррелировал с ИР_{Доц} ($r = 0,73$; $p = 0,045$) (табл. 5).

В подгруппах ЛМС и других СМТ статистически значимых корреляций выявлено не было.

Таблица 4. Взаимосвязь экспрессии генов p53-зависимой активации апоптоза (коэффициент корреляции), выделены значимые корреляции

Table 4. Correlations between expression levels of p53-dependent apoptosis activation genes (correlation coefficient), significant correlations are highlighted

	<i>PUMA</i>	<i>Bax</i>	<i>PIDD-1</i>	<i>GADD45a</i>	<i>AIFM-2</i>	<i>PMAIP-1</i>
<i>PUMA</i>		0,91	0,41	0,35	-0,05	0,15
<i>Bax</i>	<0,0001		0,31	0,44	-0,05	0,11
<i>PIDD-1</i>	<0,001	<0,05		-0,13	0,28	0,37
<i>GADD45a</i>	<0,01	<0,0005	0,33		0,17	-0,15
<i>AIFM-2</i>	0,68	0,68	<0,05	0,19		0,19
<i>PMAIP-1</i>	0,26	0,39	<0,005	0,26	0,15	

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые корреляции.

Note. Significant correlations are shown in bold.

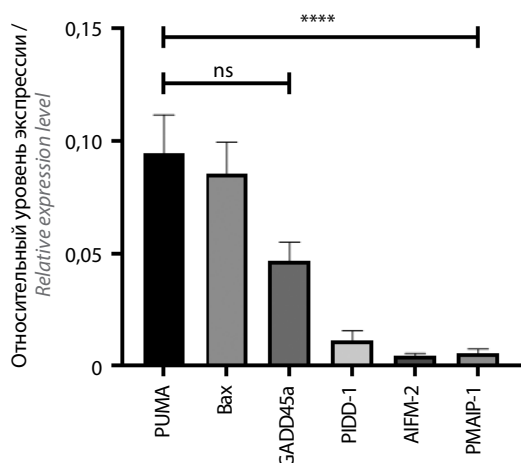


Рис. 1. Экспрессия исследуемых генов в саркомах мягких тканей.

*** $p < 0,0001$; ns – нет статистически значимой разницы

Fig. 1. Expression of the studied genes in soft tissue sarcomas. *** $p < 0.0001$; ns – difference is not significant

Анализ уровней белков генов p53-зависимой активации апоптоза в исследуемой группе сарком мягких тканей.

На следующем этапе проведен анализ количества белкового продукта генов p53-зависимой активации апоптоза (*PUMA*, *PMAIP-1*, *PIDD-1*, *Bax*, *AIFM-2*, *GADD45a*) в 60 переживающих культурах СМТ. Выявлено, что в общей группе СМТ уровень матричной РНК (мРНК) гена *PUMA* отрицательно коррелировал с уровнем экспрессии этого гена на уровне белка ($r = -0,35$; $p = 0,02$). Установлена отрицательная корреляция между уровнями белков *Bax* и *AIFM-2* ($r = -0,27$; $p = 0,04$) и положительная – между количеством *GADD45a* и *PMAIP-1*, *PUMA* ($r = 0,31$ и $r = 0,26$ соответственно; $p = 0,015$ и $p = 0,044$ соответственно) (табл. 6). Наиболее высокая экспрессия продемонстрирована для белков *Bax*, *AIFM-2* и *PIDD-1*. Статистически значимых различий между уровнями экспрессии белков в образцах

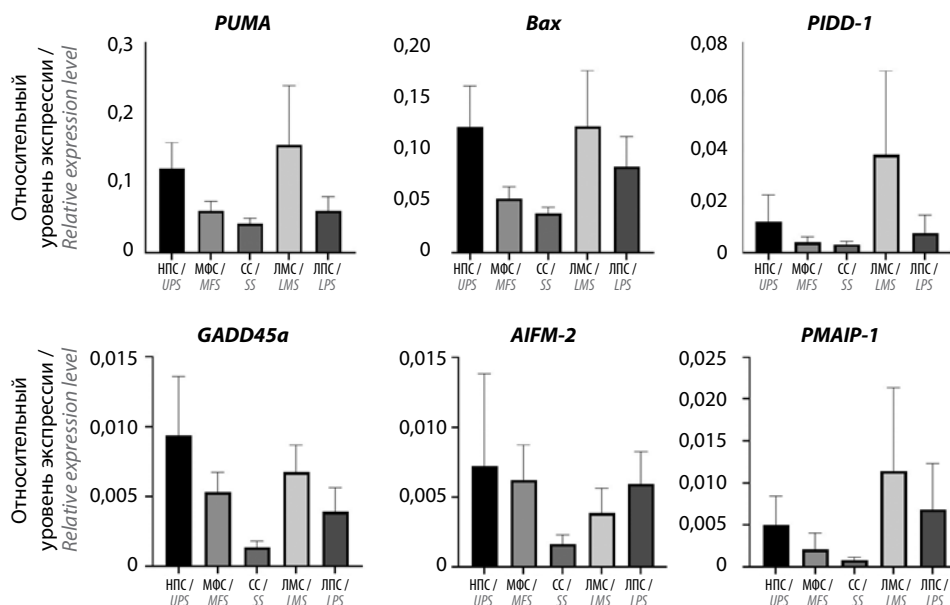


Рис. 2. Уровень экспрессии исследуемых генов в разных гистологических типах сарком мягких тканей. НПС – недифференцированные плеоморфные саркомы; МФС – миксофибросаркомы; СС – синовиальные саркомы; ЛМС – лейомиосаркомы; ЛПС – липосаркомы

Fig. 2. Expression levels of the studied genes in various histological types of soft tissue sarcomas. UPS – undifferentiated pleiomorphic sarcomas; MFS – myxofibrosarcomas; SS – synovial sarcomas; LMS – leiomyosarcomas; LPS – liposarcomas

Таблица 5. Связь экспрессии исследуемых генов с индексом резистентности химиопрепаратов (r/p)

Table 5. Correlation between expression of the studied genes and chemotherapy drug resistance index (r/p)

Препарат Drug	PUMA	Bax	PIDD-1	GADD45a	AIFM-2	PMAIP-1
Липосаркомы (общая группа) Liposarcomas (general group)						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0,04/-0,66
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц и Гем	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Липосаркомы G2-3 Liposarcomas G2-3						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	0,06/0,69	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	0,04/0,68	-/-
Доц Doc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц + Гем Doc + Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	0,03/0,76	0,02/0,79	-/-
Синовиальные саркомы Synovial sarcomas						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц + Гем Doc + Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Окончание табл. 5

End of table 5

Препарат Drug	PUMA	Вах	PIDD-1	GADD45a	AIFM-2	PMAIP-1
Пазо Pazo	-/-	-/-	0,04/0,73	-/-	0,005/0,9	-/-
Миксофибросаркомы Muxofibrosarcoma						
Докс Dox	0,06 /0,6	0,05 /0,68	-/-	-/-	-/-	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox+ Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	-/-	0,04/0,7	0,006/0,7	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	0,003/-0,88	-/-	-/-
Доц + Гем Doc +Gem	-/-	-/-	0,017/0,78	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Недифференцированные плеоморфные саркомы Undifferentiated pleiomorphic sarcomas						
Докс Dox	-/-	-/-	-/-	-/-	0,02/-0,8	-/-
Ифо Ifo	-/-	-/-	0,027/0,78	-/-	-/-	-/-
Докс + Ифо Dox + Ifo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц Doc	0,015/0,83	0,045/0,73	-/-	-/-	-/-	-/-
Гем Gem	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Доц + Гем Doc + Gem	0,048/0,71	-/-	0,015/0,83	-/-	-/-	-/-
Пазо Pazo	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Примечание. Докс – доксорубицин; Доц – доцетаксел; Гем – гемцитабин; Ифо – ифосфамид; Пазо – пазопаниб.

Note. Dox – doxorubicin; Doc – docetaxel; Gem – gemcitabine; Ifo – ifosfamide; Pazo – pazopanib.

с различными гистологическими типами СМТ не наблюдалось (рис. 3).

При анализе корреляций между уровнями экспрессии белков и ИР, полученными *in vitro*, для всех СМТ выявлена положительная корреляция средней силы между уровнем экспрессии Вах и PUMA и ИР_{Гем} ($r = 0,3$ и $r = 0,41$ соответственно; $p = 0,027$ и $p = 0,002$ соответственно). Кроме того, количество белка PUMA коррелировало с ИР_{Пазо} ($r = 0,24$; $p = 0,043$). В ходе

анализа корреляций между уровнями экспрессии белков и ИР в различных гистологических типах СМТ получены следующие результаты.

Липосаркомы. Образцы с высокой экспрессией белка Вах обладали большей резистентностью к Гем и Доц + Гем.

Синовиальные саркомы. Образцы с высокой экспрессией белка GADD45a оказались менее резистентны к Докс и Докс + Ифо по сравнению с образцами,

Таблица 6. Взаимосвязь уровней экспрессии исследуемых белков в образцах сарком мягких тканей (коэффициент корреляции)

Table 6. Correlations between expression levels of the studied genes in soft tissue sarcoma samples (correlation coefficient)

	<i>Bax</i>	<i>AIFM-2</i>	<i>GADD45a</i>	<i>PIDD-1</i>	<i>PMAIP-1</i>	<i>PUMA</i>
<i>Bax</i>		-0,26	-0,17	0,22	0,03	0,08
<i>AIFM-2</i>	0,04		-0,05	0,03	-0,13	0,03
<i>GADD45a</i>	0,2	0,68		-0,02	0,31	0,26
<i>PIDD-1</i>	0,09	0,83	0,89		0,11	0,21
<i>PMAIP-1</i>	0,83	0,31	0,01	0,44		0,05
<i>PUMA</i>	0,53	0,79	0,04	0,09	0,72	

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые корреляции.

Note. Significant correlations are shown in bold.

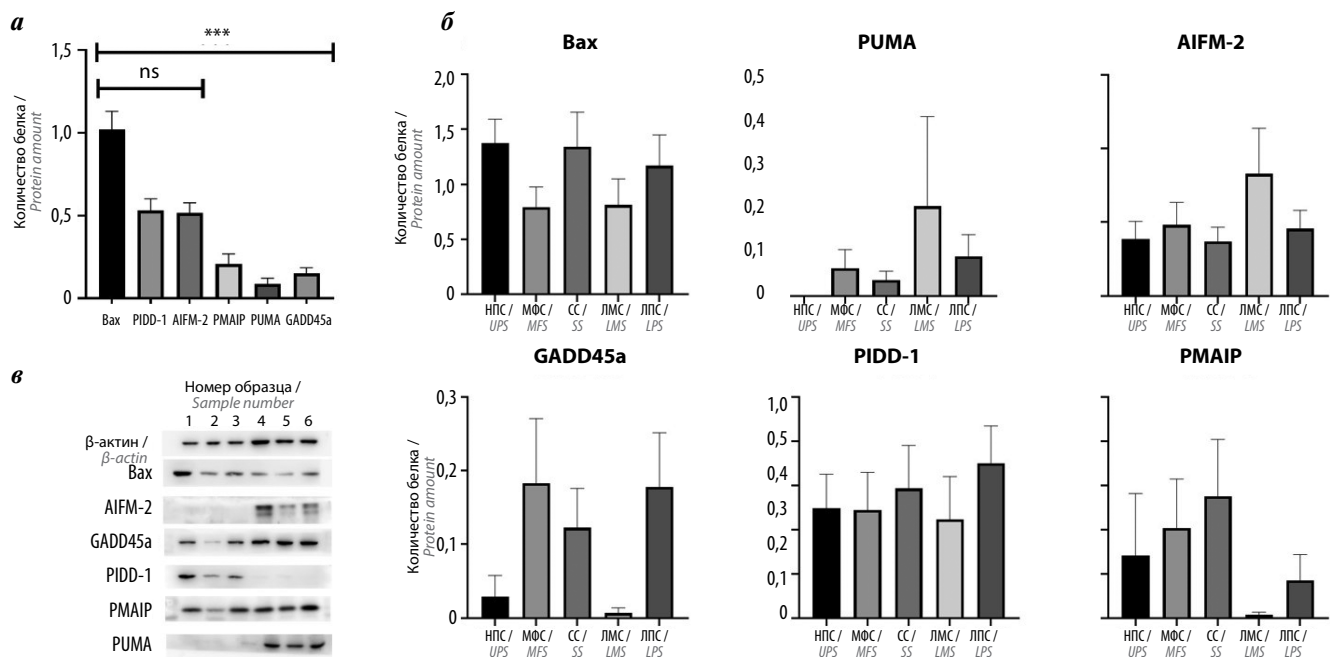


Рис. 3. Уровень экспрессии белков p53-зависимой активации апоптоза в саркомах мягких тканей: а – количество белкового продукта исследуемых генов в саркомах мягких тканей (СМТ); б – количество белка генов в разных гистологических типах СМТ; в – анализ уровня экспрессии белков методом вестерн-блоттинга в некоторых образцах СМТ. НПС – недифференцированные плеоморфные саркомы; МФС – миксофибросаркомы; СС – синовиальные саркомы; ЛМС – лейомиосаркомы; ЛПС – липосаркомы. *** $p < 0,001$; ns – нет статистически значимой разницы

Fig. 3. Expression levels of p53-dependent apoptosis activation genes in soft tissue sarcomas (STS); б – amount of proteins of the genes in various STS histological types; в – western blot analysis of protein expression level in some STS samples. UPS – undifferentiated pleiomorphic sarcomas; MFS – myxofibrosarcomas; SS – synovial sarcomas; LMS – leiomyosarcomas; LPS – liposarcomas *** $p < 0.001$; ns – difference not significant

в которых белок не детектировался; образцы с высокой экспрессией белка Bax были более чувствительны к Докс и Докс + Ифо, а образцы с экспрессией AIFM-2 – менее резистентны к Доц и Доц + Гем.

Недифференцированные плеоморфные саркомы. В ходе сравнения образцов с дифференциальной

экспрессией белка GADD45a установлено, что образцы с высокой экспрессией белка GADD45a были менее резистентны к Докс и Докс + Ифо, а также к Доц + Гем (рис. 4).

В других подгруппах СМТ в рамках этого исследования корреляционных связей выявлено не было.

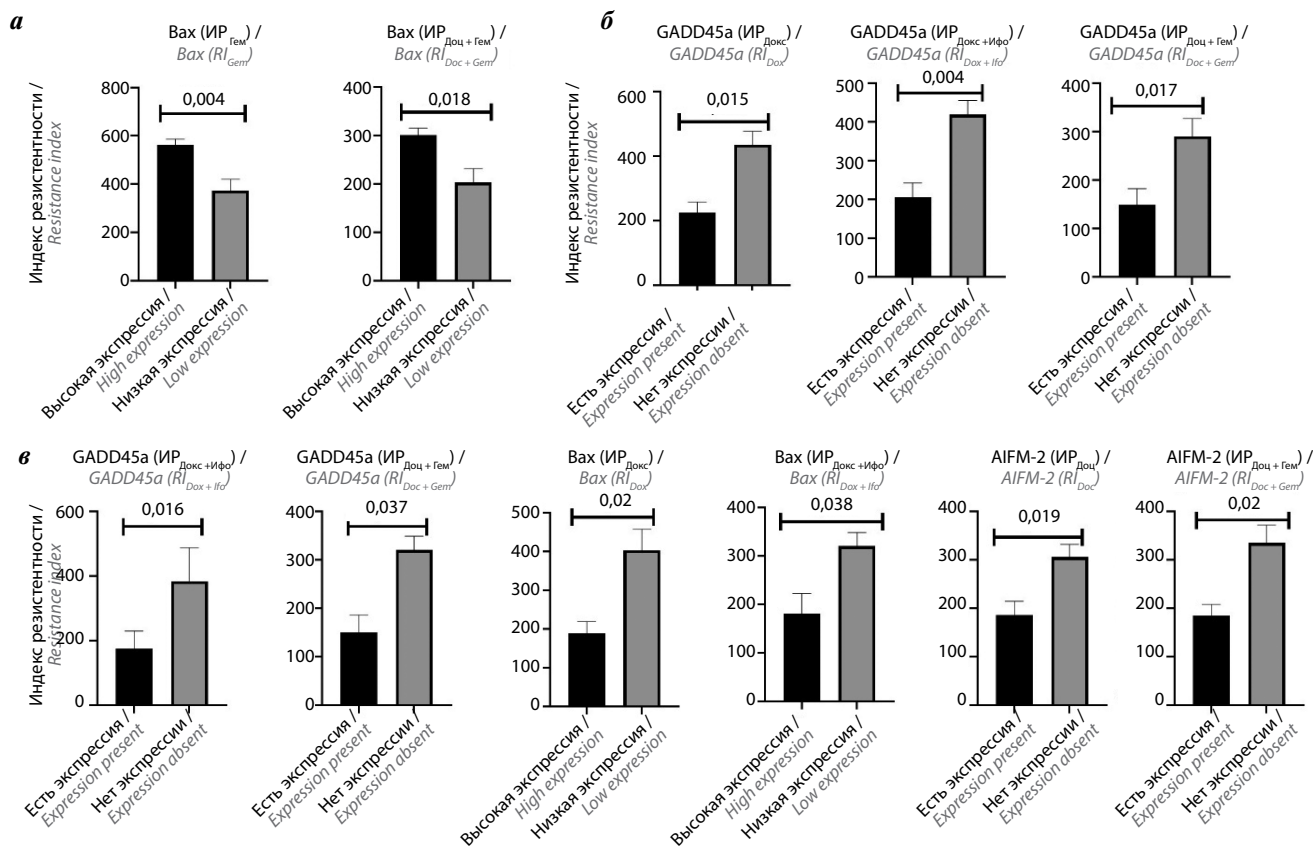


Рис. 4. Связь количества белка с индексом резистентности (ИР) химиопрепаратов: а – в липосаркомах; б – в недифференцированных плеоморфных саркомах; в – в синовиальных саркомах
Fig. 4. Correlation between the amount of protein and resistance index (RI) of chemotherapy drugs: а – in liposarcomas; б – in undifferentiated pleiomorphic sarcomas; в – in synovial sarcomas

ОБСУЖДЕНИЕ

Химиотерапия является одним из основных методов лечения СМТ высокой степени злокачественности. Она применяется совместно с основным методом лечения – хирургическим – и значительно снижает риски развития локальных рецидивов [18]. Однако данный метод имеет ряд существенных ограничений, одним из которых является резистентность опухоли к терапии. В развитие резистентности опухолевых клеток к ХТ вовлечено множество механизмов, из которых наиболее изучены рефлюкс лекарственных средств, ответ на повреждение ДНК и изменение в активности ферментов семейства СУР450 [4]. Результаты более раннего нашего исследования продемонстрировали, что экспрессия белков семейства АВС-транспортеров не играет ключевую роль в возникновении резистентности СМТ к ХТ, в то же время обнаружена связь между наличием мутаций в генах, вовлеченных в р53-зависимую активацию апоптоза, и резистентностью к Докс [6, 19]. Поскольку основным действием ХТ является индукция повреждений ДНК с последующей гибелью клеток, изучение активности апоптоза и его регуляторов будет способствовать развитию методов прогнозирования ответа на ХТ, а также поиску

новых мишеней для таргетных препаратов. В этом исследовании проанализирована экспрессия генов-регуляторов р53-зависимого апоптоза.

В ходе исследования уровней мРНК генов выявлено, что в образцах СМТ чаще всего встречались гены *PUMA*, *Vax* и *GADD45a*, в то время как среди белковых продуктов более высокая экспрессия была характерна для *Vax*, *AIFM-2* и *PIDD-1*. Таким образом, в СМТ *Vax* высоко экспрессирован на уровне как мРНК, так и белка. Данный белок является ключевым регулятором митохондриального пути апоптоза и непосредственно взаимодействует с антиапоптотическим белком *Bcl-2* [8]. Наши данные отчасти согласуются с результатами работ других научных групп. Ранее установлено, что в саркомах наблюдается высокая экспрессия антиапоптотических белков *Bcl-2*, *Bcl-xL* и *Bcl-w* [20]. Результаты еще одного исследования продемонстрировали высокое содержание белков *Vax* и *Bcl-2* в СМТ [21]. В более ранних работах не изучалась экспрессия вышеуказанных генов в НПС, которые стали рассматриваться в классификации СМТ как отдельная группа только с 2020 г. [2]. Также наша выборка содержала большее количество образцов НПС, чем в раннем исследовании. В связи с этим удалось установить, что

в некоторых образцах ген *Bax* не экспрессируется. Данное наблюдение представляется весьма важным, так как применение ингибиторов Bcl-2, действие которых направлено на активацию апоптоза за счет увеличения активности *Bax*, в настоящее время рассматривается в качестве перспективного подхода к сенситизации опухолевых клеток к Докс [22].

В ходе анализа уровней белков исследуемых генов выявлено, что их количество в основном не коррелировало с количеством мРНК этих же генов. Исключение составила экспрессия гена *PUMA*, уровень мРНК которой отрицательно коррелировал с количеством белка. Ранее было показано, что при сравнении уровней экспрессии мРНК и белка в клетках корреляции наблюдаются только в 40 % генов, что объясняется наличием посттранскрипционных и посттрансляционных модификаций, влияющих на количество конечного продукта [23, 24]. В случае гена *PUMA* обратная корреляция может также объясняться высокой активностью МАРК-киназных путей, которые в том числе являются положительными регуляторами деградации белка *Puma* [25–27].

В ходе анализа общей выборки сарком мы не обнаружили сильных корреляций между экспрессией генов, регулирующих апоптоз, и устойчивостью клеток к препаратам. В связи с наличием в данной выборке сарком различных гистологических подгрупп (18 подтипов с учетом вошедших в подгруппу «Другие саркомы») с разной активностью сигнальных путей в них такие результаты были ожидаемы [28]. Однако в ходе анализа отдельных подтипов СМТ выявлено, что в подгруппах ЛПС, СС, МФС и НПС экспрессия исследуемых генов коррелировала с резистентностью к применяемым препаратам. В основном высокая экспрессия генов ассоциировалась с резистентностью к препаратам. В подгруппах ЛПС, СС и НПС уровни исследуемых белков коррелировали с резистентностью

к препаратам и их комбинациям. Для нас было неожиданным, что высокая экспрессия проапоптотического белка *Bax* коррелировала с резистентностью к Гем и его комбинации с Доц в подгруппе ЛПС. Ранее сообщалось, что высокая экспрессия проапоптотического белка *Bax* может коррелировать с плохим ответом на ХТ и, как следствие, с низкими показателями безрецидивной выживаемости при метастатической меланоме, остром миелоидном лейкозе и лимфоме Ходжкина [29–31]. Стоит отметить, что в меланоме на ранних стадиях заболевания низкая экспрессия *Bax*, наоборот, связана с плохим ответом на ХТ и низкими показателями безрецидивной выживаемости [32]. Вероятнее всего, на ранних стадиях заболевания снижается экспрессия регуляторов апоптоза, в то время как на более поздних стадиях нарушается работа эффекторных белков сигнального каскада апоптоза и изменение экспрессии его регуляторов перестает играть существенную роль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования рассмотрена возможность применения генов p53-зависимой активации апоптоза в качестве маркеров прогноза ответа СМТ на ХТ. Значительных закономерностей в экспрессии исследуемых генов в общей группе СМТ обнаружено не было. Однако в ходе анализа их экспрессии в отдельных гистологических подгруппах выявлены корреляции с резистентностью к препаратам на уровне как мРНК, так и белка. Предполагается, что увеличение числа образцов в каждой гистологической подгруппе позволит определить панель генов для прогнозирования индивидуального ответа на различные схемы ХТ, а диагностическая ценность этих данных будет оценена при их сопоставлении с клиническими результатами лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петрова. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrov. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2019. (In Russ.).
2. Sbaraglia M., Bellan E., Dei Tos A.P. The 2020 WHO classification of soft tissue tumours: news and perspectives. *Pathologica* 2021;113(2):70–84. DOI: 10.32074/1591-951x-213
3. Judson I., Verweij J., Gelderblom H. et al. Doxorubicin alone *versus* intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(4):415–23. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70063-4
4. Neophytou C.M., Trougakos I.P., Erin N., Papageorgis P. Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. *Cancers* 2021;13(17):4363. DOI: 10.3390/cancers13174363
5. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31–46. DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-21-1059
6. Kirilin E.M., Fetisov T.I., Moiseeva N.I. et al. Soft tissue sarcoma study: association of genetic alterations in the apoptosis pathways with chemoresistance to doxorubicin. *Cancers* 2022;14(7):1796. DOI: 10.3390/cancers14071796
7. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell* 2017;171(4):950–65.e928. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.014
8. Peña-Blanco A., García-Sáez A.J. Bax, Bak and beyond – mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* 2018;285(3):416–31. DOI: 10.1111/febs.14186
9. Weiler E.S., Szabo T.G., Garcia-Carpio I., Villunger A. PIDD1 in cell cycle control, sterile inflammation and cell death. *Biochem Soc Trans* 2022;50(2):813–24. DOI: 10.1042/bst20211186
10. Tan J.H., Cao R.C., Zhou L. et al. ATF6 aggravates acinar cell apoptosis and injury by regulating p53/AIFM2 transcription in Severe Acute Pancreatitis. *Theranostics* 2020;10(18):8298–314. DOI: 10.7150/thno.46934

11. Huang Y., Liu N., Liu J. et al. Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle* 2019;18(24):3442–55. DOI: 10.1080/15384101.2019.1688951
12. Shahbandi A., Rao S.G., Anderson A.Y. et al. BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in TP53 wild-type breast cancer. *Cell Death Differ* 2020;27(11):3097–116. DOI: 10.1038/s41418-020-0564-6
13. Ren X., Liu H., Zhang M. et al. Co-expression of ING4 and P53 enhances hypopharyngeal cancer chemosensitivity to cisplatin *in vivo*. *Mol Med Rep* 2016;14(3):2431–8. DOI: 10.3892/mmr.2016.5552
14. Fairchild C.K., Floros, K.V., Jacob S. et al. Unmasking BCL-2 addiction in synovial sarcoma by overcoming low NOXA. *Cancers* 2021;13(1):2310. DOI: 10.3390/cancers13102310
15. Mathews J.C., Pouryahya M., Moosmüller C. et al. Molecular phenotyping using networks, diffusion, and topology: soft tissue sarcoma. *Sci Rep* 2019;9(1):13982. DOI: 10.1038/s41598-019-50300-2
16. Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M. et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55(22):5276–82.
17. Tapias L.F., Gilpin S.E., Ren X. et al. Assessment of proliferation and cytotoxicity in a biomimetic three-dimensional model of lung cancer. *Ann Thoracic Surg* 2015;100(2):414–21. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2015.04.035
18. Tanaka K., Ozaki T. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcomas: JCOG Bone and Soft Tissue Tumor Study Group. *Japanese J Clin Oncol* 2021;51(2):180–4. DOI: 10.1093/jjco/hyaa231
19. Moiseeva N.I., Laletina L.A., Fetisov T.I. et al. Analysis of multiple drug resistance mechanism in different types of soft tissue sarcomas: assessment of the expression of ABC-transporters, MVP, YB-1, and analysis of their correlation with chemosensitivity of cancer cells. *Int J Mol Sci* 2022;3(6):3183. DOI: 10.3390/ijms23063183
20. De Graaff M.A., de Rooij M.A., van den Akker B.E. et al. Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br J Cancer* 2016;114(11):1219–26. DOI: 10.1038/bjc.2016.117
21. Win T.T., Yusuf Y., Jaafa H. Apoptotic activities in soft tissue sarcoma: immunohistochemical study and their association with tumour characteristics. *Malaysian J Med Sci* 2013;20(2):10–6.
22. Muenchow A., Weller S., Hinterleitner C. et al. The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. *Cell Death Disease* 2020;11(8):701. DOI: 10.1038/s41419-020-02910-2
23. De Sousa Abreu R., Penalva L.O., Marcotte E.M., Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol biosyst* 2009;5(12):1512–26. DOI: 10.1039/b908315d
24. Vogel C., Marcotte E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012;13(4):227–32. DOI: 10.1038/nrg3185
25. Nakamura K., Asanuma K., Okamoto T. et al. Combination of everolimus and bortezomib inhibits the growth and metastasis of bone and soft tissue sarcomas via JNK/p38/ERK MAPK and AKT pathways. *Cancers* 2023;15(9): DOI: 10.3390/cancers15092468
26. Mauro A., Ciccarelli C., De Cesaris P.S. et al. PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci* 2002;115(Pt. 18): 3587–99. DOI: 10.1242/jcs.00037
27. Ambrose G., Portier A., Roders N. et al. Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells. *Oncotarget* 2015;6(35):38181–94. DOI: 10.18632/oncotarget.5901
28. Damerell V., Pepper M.S., Prince S. Molecular mechanisms underpinning sarcomas and implications for current and future therapy. *Signal Transduction targ Ther* 2021;6(1):246. DOI: 10.1038/s41392-021-00647-8
29. Guttà C., Rahman A., Aura C. et al. Low expression of pro-apoptotic proteins Bax, Bak and Smac indicates prolonged progression-free survival in chemotherapy-treated metastatic melanoma. *Cell Death Dis* 2020;11(2):124. DOI: 10.1038/s41419-020-2309-3
30. Köhler T., Schill C., Deininger M.W. et al. High Bax and Bcl-2 mRNA expression correlate with negative outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 2002;16(1):22–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2402340
31. Bairey O., Zimra Y., Shaklai M. et al. Bcl-2, Bcl-X, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2860–6.
32. Fecker L.F., Geilen C.C., Tchernev G. et al. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Inv Dermatol* 2006;126(6):1366–71. DOI: 10.1038/sj.jid.5700192

Вклад авторов

Т.И. Фетисов: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи, управление проектом; С.А. Хазанова, П.А. Штомпель, Е.С. Трапезникова: проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи; В.Ю. Зиновьева, А.А. Тарарькова, В.И. Маршалл, А.А. Ловенгер, И.С. Купаева, Д.В. Рогожин, А.Ю. Бокхан: получение и характеристика клинических образцов;

Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: управление проектом, редактирование.

Authors' contributions

T.I. Fetisov: research design development, conducting experiments, data analysis, article writing, project management;

S.A. Khazanova, P.A. Shtompel, E.S. Trapeznikova: conducting experiments, analyzing data, article writing;

V.Yu. Zinovyeva, A.A. Tararykova, V.I. Marshall, A.A. Lovinger, I.S. Kupaeva, D.V. Rogozhin, A.Yu. Bokhyan: obtaining and characterization of clinical samples;

G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: project management, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>
С.А. Хазанова / S.A. Khazanova: <https://orcid.org/0000-0002-8350-0021>
П.А. Штомпель / P.A. Shtompel: <https://orcid.org/0009-0000-8673-597X>
Е.С. Трапезникова / E.S. Trapeznikova: <https://orcid.org/0000-0001-6839-7436>
А.А. Тарарыкова / A.A. Tararykova: <https://orcid.org/0000-0002-5548-3295>
В.И. Маршалл / V.I. Marshall: <https://orcid.org/0000-0002-0081-2688>
А.А. Ловенгер / A.A. Lovenger: <https://orcid.org/0009-0000-3317-9543>
И.С. Купаева / I.S. Kupaeva: <https://orcid.org/0000-0003-4229-5911>
Д.В. Рогожин / D.V. Rogozhin: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>
А.Ю. Бохян / A.Yu. Bokhyan: <https://orcid.org/0000-0002-1396-3434>
Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: <https://orcid.org/0000-0002-3167-7204>
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 22-75-00100).
Funding. Research was supported by the Russian Science Foundation grant (grant No. 22-75-00100).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом биоэтики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

The study protocol was approved by the local Ethical committee on animal experimentation of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-93-101>

Clinical significance of long non-coding RNA expression in esophageal cancer depending on the phenotype of the tumor stroma

O.V. Kovaleva, P.A. Podlesnaya, E.S. Kudinova, M.A. Rashidova, V.V. Mochalnikova, 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

Introduction. Esophageal squamous cell carcinoma is a dangerous oncological disease for which there are no relevant molecular-biological and biochemical markers for diagnosis, monitoring, and prognosis. Non-coding RNAs, whose aberrant expression is characteristic of many neoplasms may be promising candidate markers.

Aim. To investigate the clinical significance of the expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301 and LINC01508 in esophageal squamous cell carcinoma depending on the phenotype of the tumor stroma.

Materials and methods. The study included 17 patients with esophageal squamous cell carcinoma, who were examined and treated at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Gene expression levels were assessed using real-time polymerase chain reaction. Immunohistochemical analysis was conducted to evaluate the expression of CD68, CD163 and inducible nitric oxide synthase. Statistical analysis of the obtained results was performed using GraphPad Prism v. 10. Differences in lncRNA expression between tumor samples and conditionally normal tissues were assessed using the Wilcoxon test for paired samples. Correlation analysis was carried out by calculating Spearman's correlation coefficient. Survival analysis was conducted using Kaplan–Meier survival curves. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results. Aberrant expression of the lncRNAs LCAL1, LINC01508 and LINC02301 was observed in tumor tissue compared to conditionally normal tissue. Specifically, the expression of LCAL1 and LINC01508 was increased in tumor tissue ($p = 0,001$ and $p = 0,007$), while the expression of lncRNA LINC02301 was decreased ($p = 0,004$). The expression of lncRNAs SNGH18 and IGFL2-AS1 showed no significant changes. ROC-analysis indicated that examining these lncRNA expressions is not suitable for diagnosing esophageal squamous cell carcinoma. Clinical significance analysis revealed no correlation between the studied lncRNA expressions and the clinicopathological characteristics of the disease correlation analysis of the lncRNAs SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301 and LINC01508 with the phenotype of tumor stroma macrophages demonstrated that LINC01508 was significantly and positively correlated with both the total number of macrophages ($r = 0.579$; $p = 0.017$) and the number of macrophages with cytotoxic and immunosuppressive phenotypes ($r = 0.567$; $p = 0.004$ and $r = 0.496$; $p = 0.045$, accordingly). In contrast, LCAL1 expression was inversely correlated with the number of cytotoxic macrophages ($r = -0.490$; $p = 0.037$). Prognostic analysis revealed that only lncRNA IGFL2-AS1 expression was associated with favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma (hazard ratio 0.374; $p = 0.039$).

Conclusion. Long non-coding RNAs are important regulatory elements in both normal and tumor cells, offering certain advantages for the diagnosis of oncological diseases due to their high specificity and stability in both tissues and circulating body fluids. Growing evidence from scientific research highlights the potential clinical application of lncRNA expression analysis as markers for early diagnosis and as potential therapeutic targets. In this study, we conducted a retrospective investigation and determined the clinical significance of lncRNAs SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301, LINC01508 in esophageal squamous cell carcinoma, thereby expanding our understanding of the molecular changes observed in the development of this disease.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma, non-coding RNAs, lncRNA, microenvironment, macrophages

For citation: Kovaleva O.V., Podlesnaya P.A., Kudinova E.S. et al. Clinical significance of long non-coding RNA expression in esophageal cancer depending on the phenotype of the tumor stroma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):93–101.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-93-101>

Клиническая значимость экспрессии длинных некодирующих РНК при раке пищевода в зависимости от фенотипа опухолевой стромы

О.В. Ковалева, П.А. Подлесная, Е.С. Кудинова, М.А. Рашидова, В.В. Мочальникова, 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

Введение. Плоскоклеточный рак пищевода является опасным онкологическим заболеванием, для которого нет релевантных молекулярно-биологических и биохимических маркеров диагностики, мониторинга и прогноза. Одними из перспективных маркеров могут выступать некодирующие РНК, aberrантная экспрессия которых характерна для многих новообразований.

Цель исследования – изучение клинической значимости экспрессии длинных некодирующих РНК (днРНК) SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301 и LINC01508 при плоскоклеточном раке пищевода в зависимости от фенотипа опухолевой стромы.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включены 17 пациентов с плоскоклеточным раком пищевода, прошедших обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина. Уровень экспрессии генов исследуемых днРНК оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Иммуногистохимическим методом проведен анализ экспрессии CD68, CD163 и индуцибельной синтазы оксида азота. Статистический анализ полученных результатов выполняли с использованием программного решения GraphPad Prism v. 10. Различия экспрессии днРНК между образцами опухолей и условно нормальных тканей оценивали с помощью критерия Уилкоксона для парных выборок. Корреляционный анализ проводили посредством определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Выживаемость анализировали путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Выявлено, что для днРНК LCAL1, LINC01508 и LINC02301 наблюдалась aberrантная экспрессия в опухолевой ткани по сравнению с условной нормой. Так, в опухолевой ткани экспрессия LCAL1 и LINC01508 оказалась повышенной ($p = 0,001$ и $p = 0,007$), в то время как для LINC02301 наблюдалось снижение экспрессии ($p = 0,004$). Экспрессия днРНК SNGH18 и IGFL2-AS1 значимо не изменялась. Результаты ROC-анализа продемонстрировали, что исследование экспрессии данных днРНК не подходит для диагностики плоскоклеточного рака пищевода. Анализ клинической значимости экспрессии изучаемых днРНК показал, что этот параметр не коррелирует с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Корреляционный анализ экспрессии днРНК SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301 и LINC01508 с фенотипом макрофагов стромы опухоли продемонстрировал, что днРНК LINC01508 значимо прямо коррелирует с содержанием как общего числа макрофагов ($r = 0,579$; $p = 0,017$), так и макрофагов цитотоксического и иммуносупрессорного фенотипов ($r = 0,567$; $p = 0,004$ и $r = 0,496$; $p = 0,045$ соответственно), а экспрессия LCAL1 обратно коррелирует с содержанием цитотоксических макрофагов ($r = -0,490$; $p = 0,037$). Анализ прогностической значимости показал, что только экспрессия днРНК IGFL2-AS1 является фактором благоприятного прогноза при плоскоклеточном раке пищевода (отношение рисков 0,374; $p = 0,039$).

Заключение. Длинные некодирующие РНК являются важными регуляторными элементами в нормальных и опухолевых клетках и обладают определенными преимуществами при диагностике онкологических заболеваний благодаря своей высокой специфичности и стабильности как в тканях, так и в циркулирующих жидкостях организма. Все больше данных, полученных в ходе научных исследований, показывают перспективы потенциального клинического применения анализа экспрессии днРНК в качестве маркеров ранней диагностики и потенциальных терапевтических мишеней. Мы провели ретроспективное исследование и определили клиническую значимость днРНК SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301, LINC01508 при плоскоклеточном раке пищевода, что расширяет наши представления о молекулярных изменениях, наблюдаемых при развитии данного заболевания.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак пищевода, некодирующие РНК, длинные некодирующие РНК, микроокружение, макрофаг

Для цитирования: Ковалева О.В., Подлесная П.А., Кудинова Е.С. и др. Клиническая значимость экспрессии длинных некодирующих РНК при раке пищевода в зависимости от фенотипа опухолевой стромы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):93–101. (На англ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-93-101>

INTRODUCTION

Esophagus squamous cell carcinoma (ESCC) is one of the most common types of malignant tumors of the digestive tract, characterized by a low 5-year survival rate. In its early stages, the disease is often asymptomatic,

resulting in late diagnosis and poor outcomes. Understanding the mechanisms of tumor development and progression in this condition contributes to the identification of new diagnostic markers and therapeutic targets. The literature describes numerous potential diagnostic and prognostic

markers for esophageal cancer, as well as their combinations for early diagnosis and disease monitoring [1–3]. However, the available data remain insufficient for successful clinical application.

It is well known that epigenetic factors, such as DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling, and regulatory non-coding RNAs (ncRNAs) play a significant role in tumor progression. The primary types of these ncRNAs are long non-coding RNAs (lncRNAs) and microRNAs. In recent years, ncRNAs have increasingly been recognized as potential diagnostic markers for various cancers, as their expression levels differ between normal and tumor tissues. Furthermore, they are regarded as markers for monitoring and predicting disease progression [4]. Another important factor in tumor pathogenesis is the tumor microenvironment, particularly tumor-associated macrophages, which represent the primary population of inflammatory infiltrating cells.

In esophageal cancer, as with certain other types of gastrointestinal tumors, a high presence of tumor-associated macrophages in the tumor stroma has been shown to have favorable prognostic significance, which sets this type of cancer apart from most other malignancies [5]. It is believed that tumor-associated macrophages, depending on their phenotype, can either promote tumor progression or inhibit its development [6]. However, this paradigm has recently shifted, with new evidence suggesting that all macrophages within the tumor, regardless of their phenotype, may contribute to its progression. Specifically, the cytotoxic activity of macrophages may lead to the selection of more malignant cell clones that are resistant to macrophage cytotoxicity, thereby promoting tumor spread. In previous studies on prostate and lung tumor models, we identified certain lncRNAs whose expression changes were observed during the process of cell resistance to cytotoxic activity [7].

Aim. To investigate the clinical significance of the expression of lncRNAs SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301, and LINC01508 in squamous cell carcinoma of the esophagus, depending on the phenotype of the tumor stroma.

MATERIALS AND METHODS

A retrospective study included 17 patients with ESCC at various stages of tumor progression, who underwent examination and treatment at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. All procedures performed in the study involving patients complied with the ethical standards of the organization's ethics committee and the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed voluntary consent was obtained from each participant included in the study. The clinical diagnosis of all patients was confirmed by morphological examination of the tumor in accordance with the International Histological Classification of Tumors of the Digestive System (World Health Organization, 2019). A description of the studied sample is provided in table 1.

Table 1. Clinical and morphological characteristics of esophagus squamous cell carcinoma patients

Parameter	Number of cases, abs. (%)
Age, years:	
≤60	8 (47)
>60	9 (53)
Gender:	
male	15 (88)
female	2 (12)
Stage:	
I–II	7 (41)
III–IV	10 (59)
Tumor size:	
T2–3	12 (71)
T4	5 (29)
Nodal status:	
N0	8 (47)
N+	9 (53)
Metastasis:	
M0	14 (82)
M+	3 (18)
Grade:	
G ₁₋₂	11 (65)
G ₃	6 (35)

The immunohistochemical study was conducted using standard techniques on sections of formalin fixed paraffin embedded tumor tissue. Antigen retrieval was performed using a Tris-EDTA buffer with a pH of 9.0. Primary antibodies to CD163 (clone 10D6; BIOCARE, 1:100), inducible nitric oxide synthase (iNOS) (SAB5500152; Sigma, 1:150), and CD68 (clone GR021, 61-0184 Genemed, 1:100) were applied to the sections and incubated for 60 minutes. The UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Scientific) universal two-component detection system was used, following the manufacturer's instructions. The prepared slides were evaluated under an OLYMPUS BX53 microscope at 200x magnification. The overall expression of CD163, iNOS, and CD68 in the tumor stroma was scored based on the percentage of antigen-positive cells: 0 – <1 %; 1 – <25 %; 2 – 25–50 %; 3 – >50 %. For further analysis, groups were classified into low-expression (0–1) and high-expression (2–3) categories.

Total RNA was isolated from the cells using the RNeasy Kit (Qiagen) in combination with the Trizol reagent following the standard protocol. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed through reverse transcription using the RevertAid RT Kit (Thermo Scientific). Gene expression levels were assessed by real-time polymerase chain reaction. Primer sequences are provided in table 2. Amplification was carried out on a CFX96 Touch amplifier (Bio-Rad) with the following thermal cycling program: 95 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C

Table 2. Primer sequences

Gene	Forward primer	Reverse primer	t, °C
<i>SNGH18</i>	5' CCTAATGCTAAACATTGGTACA 3'	5' GCAACACAGCATCACCTGTAC 3'	60
<i>LCAL1</i>	5' TCCAGCTACCTGCCACTTGC 3'	5' TGCCAACTGCTTGTTCACCTG 3'	60
<i>IGFL2-AS1</i>	5'AGCCTATTTCCAGACAAC 3'	5'AGAATCAACGACCTCTACAT 3'	53
<i>LINC01508</i>	5' GTATGGGGTGTCTAATCAGGG 3'	5' GACTGTGGCTTTGCTAATGG 3'	57
<i>LINC02301</i>	5' TCTGGGCAGAAGGATCTACG 3'	5'AGCATCTAGGCCATGTGACC 3'	60
<i>GAPDH</i>	5' TCGGAGTCAACGGATTTGGT 3'	5' TCCCGTTCTCAGCCTTGACG 3'	60

for 10 seconds, 60 °C for 30 seconds, and 72 °C for 30 seconds. All reactions were conducted in two independent biological replicates. Data analysis was performed using the Bio-Rad CFX Manager software. The housekeeping gene GAPDH was used as the reference gene. The relative gene expression levels were calculated using the fold change (FC) method with the formulas:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gene of interest}) - Ct (\text{GAPDH}),$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{sample}) - \Delta Ct (\text{control}),$$

$$FC = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}.$$

Statistical analysis of the obtained results was performed using GraphPad Prism v. 10. Differences in lncRNA expression between tumor samples and conditionally normal tissues were assessed using the Wilcoxon test for paired samples. The diagnostic method's informativeness, including its sensitivity and specificity, was analyzed by constructing ROC curves and calculating the area under the curve (AUC). Correlation analysis was conducted using Spearman's correlation coefficient. Survival analysis was performed by constructing Kaplan–Meier survival curves. The follow-up period was the time from surgery to the patient's death or their last medical visit. For the analysis of long-term treatment outcomes, patients were divided into two comparison groups based on the relative level of lncRNA expression, either above or below the median. The significance of differences was compared using the log-rank test. To assess the potential impact of various risk factors on survival, multivariate analysis was additionally performed using Cox's proportional hazards model. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

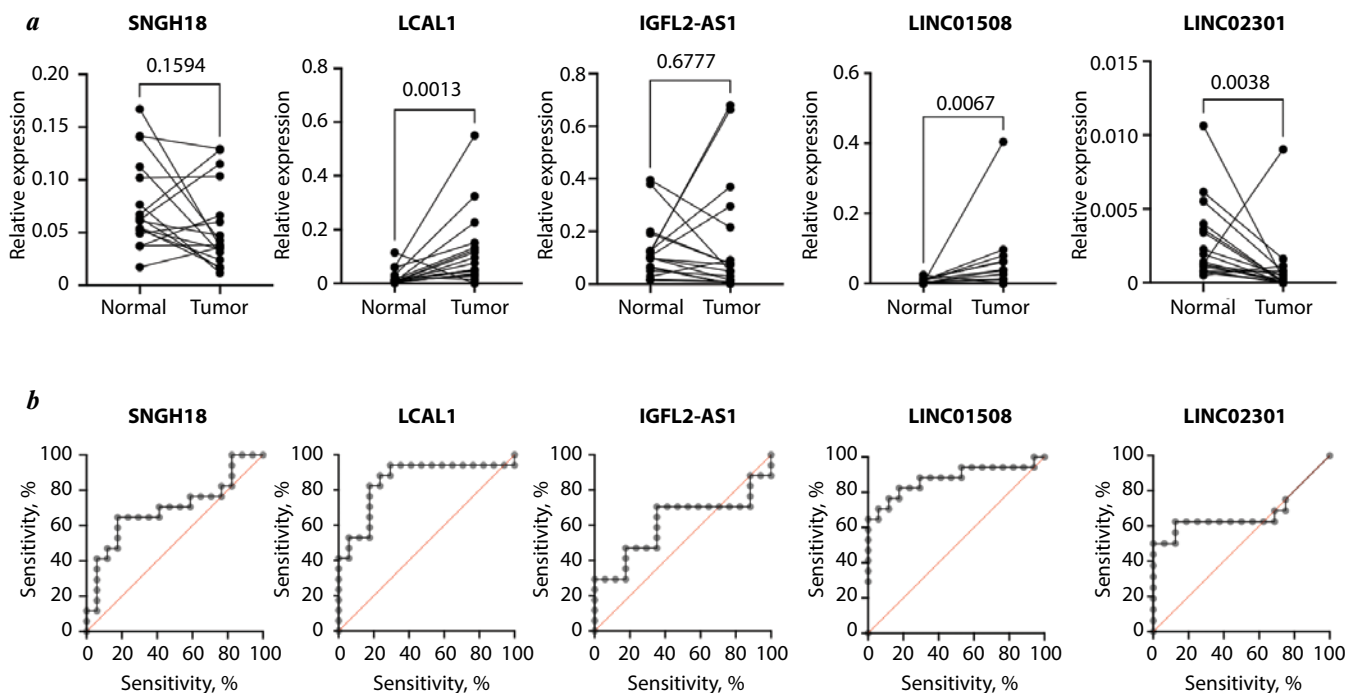
In the first stage of the study, the expression levels of the investigated lncRNAs were evaluated in both tumor tissue and conditionally normal esophageal tissue. Subsequently, the diagnostic method's informativeness was analyzed by assessing its sensitivity and specificity through the construction of ROC curves and the calculation of the AUC. The results are presented in fig. 1.

The analysis revealed that the investigated lncRNAs exhibited aberrant expression in esophageal tumors compared to normal tissue, with the changes being bidirectional. Specifically, LCAL1 and LINC01508 lncRNAs demonstrated significantly higher expression in tumor tissue, while LINC02301 showed a decrease in expression. The expression levels of SNGH18 and IGFL2-AS1 lncRNAs did not change significantly (fig. 1, a). ROC analysis indicated a trend, suggesting the potential diagnostic value of these lncRNAs, but highlighting the need for further analysis on a larger patient sample to confirm these findings (fig. 1, b).

Next, a correlation analysis was conducted to examine the relationship between the expression of the studied lncRNAs and the clinicopathological characteristics of the disease. The results of this analysis are presented in table 3.

As shown in the data presented in table 3, the expression levels of the lncRNAs SNGH18, LCAL1, IGFL2-AS1, LINC02301, and LINC01508 did not demonstrate any significant correlation with the clinicopathological characteristics of the disease.

In the next phase of the study, we assessed the prognostic significance of the investigated lncRNAs. The results of this analysis are shown in fig. 2.



*Statistically significant.

Fig. 1. Expression analysis of *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC01508*, *LINC02301* long non-coding RNA in ESCC: a – comparative analysis of *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC01508*, *LINC02301* long non-coding RNA expression in conditionally normal and tumor tissue of esophagus. Analysis was performed using the Wilcoxon test. The graphs show the p-value; b – ROC analysis for *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC01508*, *LINC02301* in esophagus squamous cell carcinoma patients – *SNGH18*, area under the ROC curve (AUC) is 0.696 ($p = 0.052$), *LCAL1*, AUC is 0.851 (0.0005*), *IGFL2-AS1*, AUC is 0.613 ($p = 0.263$), *LINC01508* AUC is 0.676 ($p = 0.089$), *LINC02301*, AUC is 0.875 ($p = 0.0002^*$)

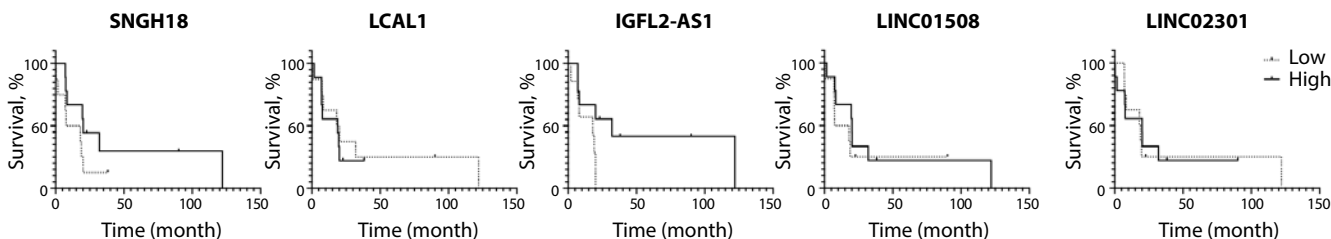


Fig. 2. Analysis of overall survival depending on the expression of *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC01508*, *LINC02301* in esophagus squamous cell carcinoma tumor tissue

The results of the study indicated that, with the exception of *IGFL2-AS1*, the expression of the investigated lncRNAs is not a prognostically significant factor in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). High expression of *IGFL2-AS1* was found to be a reliable indicator of favorable prognosis. Specifically, patients with low *IGFL2-AS1* expression had a median survival of 18 months, while those with high expression had a median survival of 32 months.

Subsequently, we conducted both univariate and multivariate analyses regarding patient survival based on lncRNA expression levels. The results are presented in table 4.

Given that the clinical significance of tumor-associated macrophages in esophageal tumors has not been definitively established, and the investigated lncRNAs are associated with tumor cells acquiring resistance to the cytotoxic activity of macrophages, the next phase of our work involved an immunohistochemical assessment of the expression of macrophage markers CD68, CD163, and iNOS in tumor samples.

We analyzed the clinical and prognostic significance of tumor infiltration by macrophages of various phenotypes. The presence of CD163+ macrophages was found to significantly inversely correlate with disease stage ($p = 0.05$). Additionally, only CD163+ macrophages showed a trend

Table 3. Correlation analysis of *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC02301*, and *LINC01508* long non-coding RNA expression with clinical and morphologic characteristics of the disease

Parameter	SNGH18	LCAL1	IGFL2-AS1	LINC02301	LINC01508
Age:					
r	−0,053	−0,109	−0,042	0,015	−0,169
p	0,840	0,674	0,874	0,956	0,513
Gender:					
r	0,000	0,149	0,112	0,075	−0,075
p	1,000	0,618	0,721	0,816	0,816
Stage:					
r	0,122	−0,268	−0,073	0,173	0,099
p	0,669	0,315	0,813	0,530	0,736
Tumor size:					
r	0,264	−0,132	0,184	0,160	0,267
p	0,328	0,646	0,506	0,569	0,321
Nodal status:					
r	0,000	−0,168	−0,120	0,122	0,244
p	1,000	0,541	0,673	0,669	0,363
Metastasis:					
r	−0,094	−0,063	−0,346	−0,287	−0,096
p	0,768	0,859	0,197	0,294	0,766
Grade:					
r	−0,126	0,075	−0,251	−0,204	0,178
p	0,660	0,808	0,350	0,456	0,518

Note. *r* – Spearman's correlation coefficient; *p* – significance level.

Table 4. Statistical analysis of prognostic significance of long non-coding RNA *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC01508*, *LINC02301*

Indicators studied	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard ratio	<i>p</i>	Hazard ratio	<i>p</i>
SNGH18 (high/low)	0,476	0,142	0,186	0,876
LCAL1 (high/low)	1,29	0,615	0,155	0,488
IGFL2-AS1 (high/low)	0,374	0,039*	2,454	0,692
LINC02301 (high/low)	0,682	0,462	8,346e+033	0,588
LINC01508 (high/low)	0,918	0,864	0,002	0,836

*Statistically significant.

towards prognostic significance. In cases of high tumor infiltration by immunosuppressive phenotype macrophages, the median survival was 20.1 months, whereas in low infiltration cases, it was only 8.3 months. No patterns were found for the overall macrophage content or for cytotoxic phenotype macrophages.

Subsequently, a correlation analysis was performed to examine the relationship between the presence of different macrophage phenotypes in the tumor stroma

and the expression of the investigated lncRNAs. The results of this analysis are presented in table 5.

As indicated by the results, lncRNA *LINC01508* shows a significant positive correlation with both the total number of macrophages and the counts of cytotoxic and immunosuppressive phenotype macrophages. This suggests that *LINC01508* may be expressed not only in tumor cells but also in macrophages; however, this hypothesis requires further investigation and verification.

Table 5. Correlation analysis of *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC02301*, and *LINC01508* lncRNA expression with the phenotype of tumor stroma macrophages

Parameter	SNGH18	LCAL1	IGFL2-AS1	LINC02301	LINC01508
CD68:					
r	0,328	0,053	0,479	0,095	0,579
p	0,198	0,842	0,050*	0,938	0,017*
CD163:					
r	0,225	0,186	0,445	-0,021	0,496
p	0,382	0,472	0,075	0,713	0,045*
iNOS:					
r	0,359	-0,490	0,166	0,089	0,567
p	0,176	0,037*	0,544	0,743	0,004*

*Statistically significant.

Note. r – Spearman's correlation coefficient; p – significance level.

Interestingly, the expression of lncRNA *LCAL1* displays an inverse correlation with the presence of cytotoxic macrophages in the tumor stroma.

DISCUSSION

This study aims to explore the clinical and prognostic significance of the lncRNAs *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC02301*, and *LINC01508*, and to analyze the correlation between their expression and macrophage infiltration in the tumor stroma across different phenotypes. It is known that a large portion of the human genome is transcribed into non-coding RNAs, such as microRNAs (miRNAs), lncRNAs, small nuclear RNAs, and others [8]. On one hand, most non-coding RNAs are still poorly understood; on the other hand, some have been identified as oncogenes or tumor suppressors, and their functional mechanisms have been studied in detail [9]. lncRNAs are molecules longer than 200 nucleotides that can regulate the expression of various genes at transcriptional, post-transcriptional, and epigenetic levels [10]. Aberrant expression of lncRNAs in tumors can serve as diagnostic and prognostic markers for many oncological diseases.

Previously, we demonstrated that tumor cells of various etiologies can develop resistance to the cytotoxic activity of macrophages. Transcriptome sequencing revealed lncRNAs whose expression changed in cell lines resistant to the cytotoxic activity of macrophages [7]. According to the limited literature data, all the lncRNAs studied in this work have tumor-promoting properties, and their expression contributes to disease progression [11, 12]. It is worth noting that the expression of *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC02301*, and *LINC01508* in squamous cell carcinoma of the esophagus has not been previously studied. We were the first to show that the expression of lncRNA *LCAL1* and *LINC01508* in tumor tissue is higher compared to normal tissue, while the expression of lncRNA *LINC02301* was found to be reduced. The expression of lncRNAs *SNGH18* and *IGFL2-AS1* did not significantly

change. The ROC analysis conducted showed that the expression of these lncRNAs is not suitable for diagnosing squamous cell carcinoma of the esophagus.

Literature indicates that lncRNA *PGM5-AS1*, which acts as a tumor growth suppressor and is characterized by reduced expression in esophageal tumors, can be used for diagnosing this pathology [8]. Interestingly, in our study, we observed higher expression of *LINC01508* in esophageal tumor tissue. In our previous research on non-small cell lung cancer samples, we found that the expression of this lncRNA was significantly decreased in tumor tissue compared to normal tissue, indicating that the change in expression of this molecule during tumor development is not universal and is tissue-specific [13].

In tumors of various etiologies, the expression of the lncRNAs we studied has been shown to hold clinical significance. For example, high expression of *SNGH18* promotes the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells [14] and is a predictor of poor prognosis in bladder cancer [15]. In our study, no association was found between the expression of lncRNAs *SNGH18*, *LCAL1*, *IGFL2-AS1*, *LINC02301*, and *LINC01508* with the clinicopathological characteristics of the disease, such as tumor differentiation and stage; however, a connection was established with disease prognosis and the phenotype of macrophages infiltrating the tumor stroma. We demonstrated that the expression of lncRNA *LINC01508* significantly correlates positively with the presence of macrophages of all phenotypes. This suggests that this lncRNA may be expressed not only in tumor cells but also in macrophages, although this hypothesis requires validation and further investigation. Interestingly, the expression of lncRNA *LCAL1* inversely correlates with the content of cytotoxic macrophages in the tumor stroma, leading to the hypothesis that this lncRNA may play a role in shaping the phenotype of immune cells in the esophageal stroma and confirming its tumor-promoting function in this type of tumor.

Literature also presents data demonstrating a correlation between the expression of lncRNA IGFL1-AS1 and the total number of macrophages in the tumor stroma [16], which is consistent with our findings.

Literature also indicates that lncRNAs IGFL2-AS1 and SNGH18 serve as markers of poor prognosis for various types of tumors, such as colorectal cancer [16] and renal cell carcinoma [17]. Our analysis of the prognostic significance of the studied lncRNAs demonstrated that only IGFL2-AS1 is a prognostically significant factor, with its high expression associated with better survival in patients with ESCC. The median overall survival in patients with high expression of IGFL2-AS1 is twice as high compared to patients with low expression. Similar patterns were observed for lncRNA SNGH18, where the median survival for patients with high expression of this lncRNA is 20 months, while for patients with low expression, it is 12.8 months; however, these results did not reach statistical significance.

It is important to note the limitations of this study, such as the small sample size, the retrospective nature of the work, and the polymerase chain reaction analysis

of lncRNA expression conducted on tumor tissue samples as a whole, without separating them into cell populations.

In summary, research on lncRNAs in esophageal cancer is still in its early stages and faces several challenges and limitations, particularly regarding clinical application. Most studies indicate that a clinically significant diagnostic tool will likely involve analyzing broad panels of markers rather than individual lncRNAs. These panels still need to be identified and validated before they can be effectively used in clinical practice.

CONCLUSION

The present study demonstrated that aberrant expression of lncRNAs LCAL1, LINC02301, and LINC01508 is observed in esophageal tumors. In contrast, lncRNA IGFL2-AS1 emerged as a significant marker of favorable prognosis for this type of tumor, despite no observed changes in its expression between normal and tumor tissues. With further fundamental and applied research, these lncRNAs may become promising markers or therapeutic targets for oncological diseases, including malignant esophageal tumors.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Chen J., Liu X., Zhang Z. et al. Early diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma: copy number alteration gene identification and cfDNA detection. *Lab Invest* 2024;104(10):102127. DOI: 10.1016/j.labinv.2024.102127
- Wang C., Wang J., Chen Z. et al. Immunohistochemical prognostic markers of esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review. *Chin J Cancer* 2017;36(1):65. DOI: 10.1186/s40880-017-0232-5
- Ma K., Kalra A., Tsai H.L. et al. Accurate nonendoscopic detection of esophageal squamous cell carcinoma using methylated DNA biomarkers. *Gastroenterology* 2022;163(2):507–9. DOI: 10.1053/j.gastro.2022.04.021
- Mohr A.M., Mott J.L. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis* 2015;35(1):3–11. DOI: 10.1055/s-0034-1397344
- Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V. et al. Immunosuppressive phenotype of esophagus tumors stroma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2020;2020:5424780. DOI: 10.1155/2020/5424780
- 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
- 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
- Zhou M., Bao S., Gong T. et al. The transcriptional landscape and diagnostic potential of long non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2023;14(1):3799. DOI: 10.1038/s41467-023-39530-1
- Han Y., Zhao G., Shi X. et al. The emerging role of long non-coding RNAs in esophageal cancer: functions in tumorigenesis and clinical implications. *Front Pharmacol* 2022;13:885075. DOI: 10.3389/fphar.2022.885075
- Подлесная П.А., Ковалева О.В., Петренко А.А. и др. Новые длинные некодирующие РНК в онкогенезе рака легкого. *Молекулярная медицина* 2023;21(5):3–11. DOI: 10.29296/24999490-2023-05-01
- Podlesnaya P.A., Kovaleva O.V., Petrenko A.A. et al. New long non-coding RNAs in lung cancer tumorigenesis. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine* 2023;21(5):3–11. (In Russ.). DOI: 10.29296/24999490-2023-05-01
- Ouyang D., Su J., Huang P. et al. Identification of lncRNAs via microarray analysis for predicting HER2-negative breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Int J Clin Expe Pathol* 2018;11(5):2621–8.
- Wu Z., Ouyang C., Peng L. Risk assessment model and nomogram established by differentially expressed lncRNAs for early-stage lung squamous cell carcinoma. *Transl Cancer Res* 2020;9(9):5304–14. DOI: 10.21037/tcr-20-999
- Ковалева О.В., Подлесная П.А., Мочальникова В.В. и др. Клиническая значимость экспрессии днРНК LINC01508 при немелкоклеточном раке легкого. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2024;177(4):502–5. DOI: 10.47056/0365-9615-2024-177-4-502-505
- Kovaleva O.V., Podlesnaya P.A., Mochalnikova V.V. et al. Clinical significance of LINC01508 lncRNA expression in non-small cell lung cancer. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2024;177(4):502–5. (In Russ.). DOI: 10.47056/0365-9615-2024-177-4-502-505
- Fan H., Yuan J., Li Y. et al. MKL1-induced lncRNA SNHG18 drives the growth and metastasis of non-small cell lung cancer via the miR-211-5p/BRD4 axis. *Cell Death Dis* 2021;12(1):128. DOI: 10.1038/s41419-021-03399-z
- Ochoa A., Zhang J., Choi W. et al. MP72-06 The long non-coding RNA snhg18 promotes PPAR γ function and “luminal” gene expression in muscle-invasive bladder cancer. *J Urology* 2015;193(4S):e923. DOI: 10.1016/j.juro.2015.02.2640
- Cen X., Huang Y., Lu Z. et al. LncRNA IGFL2-AS1 promotes the proliferation, migration, and invasion of colon cancer cells and is associated with patient prognosis. *Cancer Manag Res* 2021;13:5957–68. DOI: 10.2147/CMAR.S313775
- Pan Y., Lu X., Shu G. et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of lncRNA IGFL2-AS1 confers sunitinib resistance in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2023;83(1):103–16. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3432

Autrors' contributions

O.V. Kovaleva: analysis of literary data, statistical data processing, article writing;
P.A. Podlesnaya, E.S. Kudinova, M.A. Rashidova: obtaining experimental data;
V.V. Mochalnikova: collecting material for research, obtaining experimental data;
A.N. Gratchev: development of the research concept, article writing.

Вклад авторов

О.В. Ковалева: анализ данных литературы, статистическая обработка данных, написание текста статьи;
П.А. Подлесная, Е.С. Кудинова, М.А. Рашидова: получение экспериментальных данных;
В.В. Мочальникова: сбор материала для исследования, получение экспериментальных данных;
А.Н. Грачев: разработка концепции исследования, написание текста статьи.

ORCID of authors / ORCID авторов

O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
P.A. Podlesnaya: <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>
E.S. Kudinova: <https://orcid.org/0009-0006-4532-8597>
M.A. Rashidova: <https://orcid.org/0000-0002-3267-4232>
V.V. Mochalnikova: <https://orcid.org/0000-0001-5275-7134>
A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00356, <https://rscf.ru/project/24-15-00356>).

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 24-15-00356, <https://rscf.ru/project/24-15-00356>).

Article submitted: 16.10.2024. **Accepted for publication:** 11.11.2024. **Published online:** 11.12.2024.

Статья поступила: 16.10.2024. **Принята к публикации:** 11.11.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-102-113>

Роль иммуногистохимического исследования в определении молекулярного подтипа рака мочевого пузыря

М.В. Беркут¹, А.С. Артемьева¹, А.В. Хохлова¹, А.Э. Саад², А.К. Носов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ООО «Многопрофильная клиника Сестрорецкая»; Россия, 197706 Санкт-Петербург, Сестрорецк, ул. Пограничников, 2, стр. 1

Контакты: Мария Владимировна Беркут berkutv91@gmail.com

Введение. Результаты геномного профилирования мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (РМП) на основе выделения матричной РНК (мРНК) продемонстрировали значительное молекулярное разнообразие опухолей, объясняющее широкий спектр клинических проявлений и различные ответы на традиционные методы лечения. Однако, несмотря на ценность молекулярного профилирования мРНК для понимания биологического поведения опухоли, его внедрение в рутинную клиническую практику затруднено из-за технологической сложности и высокой стоимости методики геномного секвенирования. Поэтому определение молекулярного подтипа РМП на основе иммуногистохимического исследования может рассматриваться как альтернатива мРНК-профилированию, однако необходима апробация метода на клиническом материале.

Цель исследования – оценка прогностической значимости иммуногистохимического метода при определении молекулярного подтипа уротелиального рака с использованием суррогатной панели из 13 маркеров с помощью метода полуколичественного расчета гистохимического индекса.

Материалы и методы. В ретроспективное когортное исследование вошли 49 пациентов с РМП, которым с 2013 по 2016 г. после предшествующей трансуретральной резекции (ТУРМП) в условиях одного центра выполнена радикальная цистэктомия (РЦЭ). Критериями включения в исследование были возраст больных от 18 до 75 лет, гистологически верифицированный РМП и наличие в научной лаборатории морфологии опухолей на момент проведения иммуногистохимического исследования фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков после ТУРМП и РЦЭ. Критерии исключения: редкие гистологические варианты РМП, осложнения хирургического лечения IV–V степени по классификации Clavien–Dindo в период госпитализации, проведение ранее ТУРМП в других медицинских учреждениях. Определение молекулярных подтипов выполнено с помощью иммуногистохимического метода на иммуноштейнере Ventana BenchMark XT (Roche, США) по классической методике на депарафинизированных срезах с использованием подтип-специфической панели из 13 антител, рекомендованной таксономией Лунда (LundTax). В зависимости от степени гиперэкспрессии базальных и/или люминальных антител выделены 4 подтипа уротелиального рака: люминальный А (UroA), люминальный В (UroB), базальный (Basal) и геномно нестабильный (GU). Первичной конечной точкой исследования были показатели 5-летней безрецидивной выживаемости на материале после ТУРМП и РЦЭ, вторичной конечной точкой – 5-летней общей выживаемости на этом же материале.

Результаты. С помощью иммуногистохимического анализа с использованием суррогатной панели маркеров на сохраненном гистологическом материале после ТУРМП удалось определить подтип уротелиального рака у 38 (77,6 %) пациентов, после РЦЭ – у 39 (79,5 %). Доли подтипов UroA, UroB и GU после ТУРМП и РЦЭ были практически равными; реже всего выявлялся подтип Basal – 4 (8,2 %) и 5 (10,2 %) случаев соответственно. При оценке первичной конечной точки 5-летняя безрецидивная выживаемость после ТУРМП (*log-rank*-тест; $p = 0,85$) и РЦЭ (*log-rank*-тест; $p = 0,95$) не различалась между выявленными подтипами уротелиального рака. При оценке вторичной конечной точки статистической разницы в 5-летней ОВ₁ (*log-rank*-тест; $p = 0,94$) и ОВ₂ также не установлено (*log-rank*-тест; $p = 0,92$). Результаты многофакторного регрессионного анализа продемонстрировали, что наиболее значимыми предикторами рецидива уротелиального рака после радикального лечения являются клиническая стадия IIIA ($p = 0,017$) и патоморфологическая стадия II ($p = 0,021$), а на показатели ОВ существенное влияние оказывали патоморфологические стадии IIIA ($p = 0,003$) и IVA ($p = 0,019$).

Заключение. Определение молекулярного подтипа уротелиального рака с использованием суррогатной панели из 13 маркеров методом полуколичественного расчета гистохимического индекса не продемонстрировало эффективности и прогностической значимости: выделенные нами 4 подтипа уротелиального рака не оказали значимого влияния на отдаленные онкологические показатели.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, молекулярный подтип рака мочевого пузыря, лечение рака мочевого пузыря, иммуногистохимическое исследование

Для цитирования: Беркут М.В., Артемьева А.С., Хохлова А.В. и др. Роль иммуногистохимического исследования в определении молекулярного подтипа рака мочевого пузыря. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):102–13. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-102-113>

The role of immunohistochemical analysis in determining the molecular subtypes of bladder cancer

M.V. Berkut¹, A.S. Artemyeva¹, A.V. Khokhlova¹, A.I. Saad², A.K. Nosov¹

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochny Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

²Multidisciplinary Clinic Sestroretskaya; Bld. 1, 2 Pogradnichnikov St., Sestroretsk, Saint Petersburg 197706, Russia

Contacts: Mariya Vladimirovna Berkut berkutv91@gmail.com

Introduction. The results of genomic profiling of muscle-invasive bladder cancer (BC) based on messenger RNA (mRNA) extraction showed significant molecular variety of the tumors underlying the wide spectrum of clinical manifestations and responses to traditional treatment methods. However, despite the valuableness of molecular mRNA profiling for understanding biological behavior of the tumor, its implementation in routine clinical practice is complicated due to technological complexity and high cost of genomic sequencing. Therefore, determination of BC molecular subtype based on immunohistochemical examination can be considered an alternative to mRNA profiling. However, the method should be validated using clinical material.

Aim. To evaluate prognostic significance of immunohistochemical method in determination of urothelial cancer molecular subtype using a surrogate panel consisting of 13 markers and semiquantitative calculation of the histochemical index.

Materials and methods. The retrospective cohort study included 49 patients with BC who underwent radical cystectomy (RC) after previous transurethral resection (TURBT) between 2013 and 2016 at the center. The inclusion criteria were patient age between 18 and 75 years, histologically verified BC, and availability of formalin-fixed paraffin embedded blocks after TURBT and RC at the Clinical Laboratory of Morphology. The exclusion criteria were rare histological types of BC, grade IV–V surgical complications per the Clavien–Dindo classification during hospitalization, TURBT performed at other medical facilities. Molecular subtypes were determined using the immunohistochemical method on the Ventana BenchMark XT (Roche, USA) immunostainer per the traditional technique for deparaffinized sections with subtype-specific panel consisting of 13 antibodies recommended by the Lund taxonomy (LundTax). Depending on the hyperexpression level of basal and/or luminal antibodies, 4 urothelial cancer subtypes were identified: luminal A (UroA), luminal B (UroB), basal and genomically unstable (GU). The first endpoint of the study was 5-year recurrence-free survival on TURBT and RC material, secondary endpoint was 5-year overall survival on the same material.

Results. Using immunohistochemical analysis with a surrogate marker panel of preserved histological material after TURBT, urothelial cancer subtype was determined in 38 (77.6 %) patients, after RC – in 39 (79.5 %) patients. Percentages of UroA, UroB and GU subtypes after TURBT and RC were almost identical; the rarest type was Basal with 4 (8.2 %) and 5 (10.2 %) cases, respectively. Evaluation of the primary endpoint showed that 5-year recurrence-free survival after TURBT (*log-rank* test; $p = 0.85$) and RC (*log-rank* test; $p = 0.95$) did not differ in various urothelial cancer subtypes. Evaluation of the secondary endpoint did not show significant statistical difference in 5-year OS₁ (*log-rank* test; $p = 0.94$) and OS₂ (*log-rank* test; $p = 0.92$). Multivariate regression analysis showed that the most significant predictors of BC recurrence after radical treatment were clinical stage IIIA ($p = 0.017$) and pathomorphological stage II ($p = 0.021$), while OS rates were significantly affected by pathomorphological stages IIIA ($p = 0.003$) and IVA ($p = 0.019$).

Conclusion. Determination of urothelial cancer molecular subtype using a surrogate panel of 13 markers and semiquantitative calculation of the histochemical index did not show effectiveness and prognostic significance: the identified 4 subtypes of urothelial cancer did not significantly affect long-term oncological outcomes.

Keywords: bladder cancer, urothelial cancer molecular subtype, bladder cancer treatment, immunohistochemical examination

For citation: Berkut M.V., Artemyeva A.S., Khokhlova A.V. et al. The role of immunohistochemical analysis in determining the molecular subtypes of bladder cancer. *Uspekhii molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):102–13. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-102-113>

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) является одним из распространенных злокачественных заболеваний: в 2020 г. в мире зарегистрированы 573 278 новых случаев данной патологии, что составляет 3 % всех случаев рака у человека, при этом при первичном обращении мышечно-инвазивная форма заболевания наблюдается примерно в 1/4 случаев [1]. В ряде современных исследований геномный профиль мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (МИРМП) проанализирован с использованием нескольких молекулярных платформ, включая соматические мутации ДНК, вариации числа копий, метилирование ДНК, экспрессию матричной РНК (мРНК), экспрессию микроРНК, микробный и протеомный анализы [2, 3]. Такой комплексный подход продемонстрировал значительное молекулярное разнообразие МИРМП, что может объяснить широкий спектр клинических проявлений и различные ответы на традиционные методы лечения при этом заболевании. Кроме того, за последние годы классификация РМП претерпела изменения, что позволило включить новые молекулярные и геномные данные в обновленную классификацию Всемирной организации здравоохранения 2022 г. [4]. Это, возможно, улучшит диагностику, лечение и прогноз заболевания.

На сегодняшний день предложены несколько систем молекулярной классификации МИРМП, основанных на геномном профилировании, согласно которым выделяют 2 основных молекулярных подтипа данной опухоли: базальный и люминальный [5]. Люминальные опухоли обычно имеют папиллярную конфигурацию и экспрессируют маркеры уротелиальной дифференцировки, такие как уроплакины, цитokerатин (СК) 20 (СК20), GATA3, фактор роста фибробластов 3 (FGFR3), E-кадгерин и гены раннего клеточного цикла. В отличие от них базальные опухоли экспрессируют маркеры базального слоя уротелия, включая кластер дифференцировки 44 (CD44), СК5/6 и СК14, при этом зачастую дополнительно выявляется плоскоклеточная дифференцировка опухоли [5].

В 2019 г. предпринята попытка достижения международного консенсуса по молекулярной классификации МИРМП на основе анализа 1750 образцов опухолей с мышечной инвазией из 16 наборов данных и 2 дополнительных когорт с целью сравнения 6 схем молекулярной классификации [2]. А. Катопи и соавт. выделили 6 молекулярных подтипов этой опухоли: люминальный папиллярный, люминальный неуточненный, люминальный нестабильный, богатый стромой, базальный/плоскоклеточный и нейроэндокринный [2]. Установлено, что молекулярные подтипы РМП различаются ответом на варианты лекарственной терапии, а также показателями онкологической выживаемости. Наихудший прогноз выявлен для опухолей нейроэндокринного и базального/плоскоклеточного подтипов. Среди остальных 4 молекулярных подтипов МИРМП наиболее благоприятный прогноз отмечен для люминального

нестабильного подтипа. Подтипы папиллярный, люминальный неуточненный и богатый стромой продемонстрировали схожие показатели выживаемости. Что касается ответа на системное лечение, не обнаружено корреляции между неoadьювантной химиотерапией или терапией ингибиторами контрольных точек и молекулярными подтипами.

Молекулярная классификация РМП, основанная на профилировании экспрессии геномной мРНК, предоставляет ценную информацию о биологическом поведении опухоли. Однако ее внедрение в рутинную клиническую практику затруднено из-за технологической сложности и ресурсозатратности аналитического метода. Результаты недавних исследований показали, что иммуногистохимический (ИГХ) метод может служить альтернативой для идентификации молекулярных подтипов уротелиального рака (УР) [6]. Использование небольшого набора маркеров – люминальных (GATA3, СК20 и уроплакин II) и базальных (СК5/6 и СК14) – позволяет эффективно классифицировать РМП на люминальные и базальные подтипы.

Так, в ходе исследования С.С. Guo и соавт. удалось идентифицировать молекулярные подтипы РМП с чувствительностью 80 % на основе только ИГХ-исследования экспрессии белков GATA3 и СК5/6, проведенного в центрах первичной медико-санитарной помощи [7]. И.А. Мещерякова и соавт. выполнили молекулярное профилирование 56 образцов УР, полученных от пациентов моложе 45 лет с использованием ИГХ-метода, основанного на общих принципах таксономии, разработанной шведскими учеными из Лундского университета (Швеция) (LundTax) [8]. Результаты исследования показали, что классификация LundTax, проведенная на основе ИГХ-анализа, универсальна; также продемонстрирована высокая воспроизводимость молекулярных подтипов, встречающихся у пожилых пациентов. Кроме того, выявлено, что преобладает уротелиоподобный А подтип УР, ассоциированный с более благоприятным прогнозом и наилучшими показателями выживаемости (78 % случаев). По мнению авторов, подобная адаптация ИГХ-типирования УР может обладать довольно высокой диагностической значимостью и высокой воспроизводимостью и использоваться в специализированных клиниках онкологического профиля [8].

На сегодняшний день известно, что выявление молекулярного подтипа УР является эффективным инструментом для определения исходов заболевания и ответа на лекарственную терапию. Тем не менее профилирование опухолей на основе геномного секвенирования довольно затруднительно, ресурсозатратно и требует много времени для внедрения в клиническую практику, поэтому типирование РМП на основе более доступного ИГХ-анализа является перспективным направлением. Данные литературы показывают, что отдельные панели антител могут иметь диагностическую и прогностическую значимость [9]. В сложившейся

ситуации для дальнейшей проверки результатов многоцентровых исследований необходимы глубокие знания биологических особенностей каждого маркера в условиях канцерогенеза УР, внутри- и межопухольевой гетерогенности МИРМП, а также обязательна стандартизация панели ИГХ-маркеров для идентификации молекулярных подтипов РМП, что обуславливает актуальность настоящей работы.

Цель исследования — оценка прогностической значимости ИГХ-метода при определении молекулярного подтипа УР с использованием суррогатной панели из 13 маркеров методом полуколичественного расчета гистохимического индекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для данного ретроспективного наблюдательного исследования рандомно отобраны данные медицинских карт 49 пациентов, с 2013 по 2016 г. получавших хирургическое лечение по поводу РМП на базе отделения онкоурологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Петрова.

Критерии включения в исследование: возраст пациентов от 18 до 75 лет, гистологически верифицированный УР, наличие в научной лаборатории морфологии опухолей на момент проведения ИГХ-исследования фиксированных в формалине и залитых в парафин блоков после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря (ТУРМП) и радикальной цистэктомии (РЦЭ).

Критерии исключения: возраст пациентов старше 75 лет, редкие гистологические варианты опухоли, отличные от УР (саркоматоидный, плазмочитоидный, нейроэндокринный), осложнения лечения IV–V степени по классификации Clavien–Dindo после ТУРМП или РЦЭ, проведение ранее ТУРМП в других медицинских учреждениях.

Определение молекулярных подтипов УР выполнено с помощью ИГХ-метода на иммуноштейнере Ventana BenchMark XT (Roche, США) по классической методике на депарафинизированных срезах толщиной 5 мкм, расположенных на положительно заряженных стеклах, согласно протоколам производителей. Применена подтип-специфическая панель из 13 антител, рекомендованная исследователями LundTax [2]: антител к СК44, СК14, СК5/6, СК7, рецептору эпидермального фактора роста (EGFR), p53, p63, СК20, СК7, CyclinD1, GATA3, рецептору эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2), sp73. В зависимости от степени гиперэкспрессии базальных и/или люминальных антител выделены 4 молекулярных подтипа РМП: люминальный А (UroA), люминальный В (UroB), базальный (Basal) и геномно нестабильный (GU). Для подтипа UroA характерны минимальная реакция на СК20 и СК5/6 (только мембранное окрашивание клеток) и положительная реакция на GATA3 и sp73; для подтипа UroB — более выраженное окрашивание СК14, диффузное окрашивание СК5/6 и СК20 и положительное окрашивание GATA3 и sp73; для подтипа Basal — более вы-

сокая интенсивность окрашивания СК5/6, СК14, а также положительное окрашивание EGFR и p63, при этом окрашивание GATA3, sp73 было отрицательным во всех клетках; остальные комбинации реакций антител (преимущественно отрицательно — цитокератины СК5/6, СК20 и положительно — HER2) расценивались как подтип GU.

Интенсивность реакций с антигенами оценивалась полуколичественно по выраженности окрашивания цитоплазмы или базальной мембраны. Для каждого из применяемых биомаркеров рассчитывали гистохимический индекс (Histochemical score, H-score) по формуле:

$$H\text{-score} = \sum (P_i \times i),$$

где i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3; P_i — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Первичной конечной точкой была 5-летняя безрецидивная выживаемость (БРВ) для каждого молекулярного подтипа, которая оценивалась как период времени (мес) от момента проведения радикального лечения до возникновения рецидива или контакта с пациентом. Вторичной конечной точкой была 5-летняя общая выживаемость (ОВ), которая оценивалась как период времени (мес) от момента радикального лечения до летального исхода от любой причины или контакта с пациентом.

Статистический анализ проводили с использованием программы StatTech v. 4.2.6 (ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Те их них, которые имели нормальное распределение, описывали с использованием средних арифметических величин (M), стандартных отклонений (SD) и 95 % доверительного интервала (ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные оценивали с помощью медианы (Me) и нижнего (Q_1) и верхнего (Q_3) квартилей.

Анализ функции выживаемости пациентов проводили по методу Каплана–Майера. График ее оценки представляет собой убывающую ступенчатую линию, значения между точками наблюдений считаются константными.

Анализ выживаемости пациентов проводили по методу регрессии Кокса, подразумевающему прогнозирование риска наступления события для исследуемого объекта и оценку влияния заранее определенных независимых переменных (предикторов) на этот риск. Риск рассматривается как функция, зависящая от времени. Базовые предположения, лежащие в основе метода, состоят в том, что все объясняющие переменные независимы, линейно влияют на риск наступления события, а также что риски наступления события для любых двух объектов в любой отрезок времени пропорциональны. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний возраст пациентов исследуемой группы составил $63,39 \pm 8,09$ года (95 % ДИ 61,06–65,71), что свидетельствует о преобладании пожилых больных. Подавляющее большинство пациентов составили мужчины (43/49; 87,8 %). Индекс массы тела больных в среднем оказался равен $26,77 \pm 5,19$ (95 % ДИ 25,28–28,15). Неoadъювантную терапию получили только 6 (12,2 %) пациентов, адъювантную терапию после РЦЭ – 5 (10,2 %).

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

В ходе анализа патоморфологических периоперационных показателей дискордантности между степенью дифференцировки после ТУРМП и РЦЭ не установлено ($p > 0,05$); показатель наличия карциномы *in situ* не различался между этапами хирургического лечения ($p = 0,120$): после ТУРМП она обнаружена у 5 (10,2 %) пациентов, после РЦЭ – у 3 (6,1 %). У 11 (22,4 %) больных выявлен УР I стадии, у 12 (24,5 %) – II, у 23 (46,9 %) – IIIA, у 2 (4,1 %) – IIIB, у 1 (2 %) – IVA. После РЦЭ отмечено выраженное увеличение случаев местно-распространенного УР IIIB стадии: 13 (26,5 %) случаев ($p = 0,045$), при этом влияния неoadъювантной

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование ($n = 49$)

Table 1. Characteristics of the patients included in the study ($n = 49$)

Показатель Parameter	Значение Value	95 % ДИ (Q_1-Q_3) 95 % CI (Q_1-Q_3)
Возраст ($M \pm SD$), лет Age ($M \pm SD$), years	$63,39 \pm 8,09$	61,06–65,71
Индекс массы тела, $M \pm SD$ Body mass index, $M \pm SD$	$26,77 \pm 5,19$	25,28–28,26
Пол, n (%): Sex, n (%):		
мужской male	43 (87,8)	75,2–95,4
женский female	6 (12,2)	4,6–24,8
Неoadъювантная терапия, n (%) Neoadjuvant therapy, n (%)	6 (12,2)	4,6–24,8
Адъювантная терапия, n (%) Adjuvant therapy, n (%)	5 (10,2)	3,4–22,2
Степень дифференцировки опухоли на момент выполнения ТУРМП, n (%): Tumor differentiation grade at the time of TURBT, n (%):		
G ₁	5 (10,2)	3,4–22,2
G ₂	5 (10,2)	3,4–22,2
G ₃	39 (79,6)	61,4–85,4
Степень дифференцировки опухоли на момент выполнения РЦЭ, n (%): Tumor differentiation grade at the time of RC, n (%):		
G ₁	5 (10,2)	3,4–22,2
G ₂	6 (12,2)	4,6–24,8
G ₃	38 (77,6)	63,4–88,2
Рак <i>in situ</i> , n (%): In situ carcinoma, n (%):		
на момент выполнения ТУРМП at the time of TURBT	2 (4,1)	0,5–14,0
на момент выполнения РЦЭ at the time of RC	3 (6,1)	0,5–14,0
Число удаленных лимфатических узлов (Me), n Number of resected lymph nodes (Me), n	18	13–22
Поражение регионарных лимфатических узлов, n (%) Affected regional lymph nodes, n (%)	13 (26,5)	14,9–41,1
Положительный хирургический край, n (%) Positive surgical margin, n (%)	1 (2)	0,1–10,9

Окончание табл. 1

End of table 1

Показатель Parameter	Значение Value	95 % ДИ (Q ₁ –Q ₃) 95 % CI (Q ₁ –Q ₃)
Клиническая стадия по классификации American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8-го издания на момент выполнения ТУРМП, n (%): Clinical stage per the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification, 8 th edition, at the time of TURBT, n (%):		
I	11 (22,4)	11,8–36,6
II	12 (24,5)	13,3–38,9
IIIА	23 (46,9)	32,5–61,7
IIIВ	2 (4,1)	0,5–14,0
IVА	1 (2)	0,1–10,9
Патоморфологическая стадия по классификации AJCC 8-го издания на момент выполнения РЦЭ, n (%): Pathomorphological stage per the AJCC classification, 8 th edition, at the time of RC, n (%):		
I	15 (30,6)	18,3–45,4
II	9 (18,4)	8,8–32,0
IIIА	11 (22,4)	11,8–36,6
IIIВ	13 (26,5)	14,9–41,1
IVА	1(2)	0,1–10,9
Молекулярный подтип опухоли на момент выполнения ТУРМП, n (%): Tumor molecular subtype at the time of TURBT, n (%):		
не определен undetermined	11 (22,4)	11,8–36,6
UroA	10 (20,4)	10,2–34,3
UroB	10 (20,4)	10,2–34,3
Basal	4 (8,2)	2,3–19,6
GU	14 (28,6)	16,6–43,3
Молекулярный подтип на момент выполнения РЦЭ, n (%): Tumor molecular subtype at the time of RC, n (%):		
не определен undetermined	10 (20,4)	10,2–34,3
UroA	7 (14,3)	5,9–27,2
UroB	11 (22,4)	11,8–36,6
Basal	5 (10,2)	3,4–22,2
GU	16 (32,7)	19,9–47,5

Примечание. ТУРМП – трансуретральная резекция стенки мочевого пузыря; РЦЭ – радикальная цистэктомия; ДИ – доверительный интервал; M – среднее значение; SD – стандартное отклонение; Me – медиана; Q₁ – нижний квартиль; Q₃ – верхний квартиль; UroA – люминальный А подтип; UroB – люминальный В подтип; Basal – базальный подтип; GU – геномно нестабильный подтип.

Note. TURBT – transurethral resection of bladder tumor; RC – radical cystectomy; CI – confidence interval; M – mean; SD – standard deviation; Me – median; Q₁ – lower quartile; Q₃ – higher quartile; UroA – luminal A subtype; UroB – luminal B subtype; Basal – basal subtype; GU – genomically unstable subtype.

терапии на частоту снижения стадии заболевания (<pT2N0N0 (I стадия)) обнаружено не было.

Идентифицировать молекулярный подтип УР ИГХ-методом на сохраненном гистологическом материале после ТУРМП удалось у 38 (77,6 %) из 49 пациентов, после РЦЭ – у 39 (79,5 %). Реже всего выявлялся базальный подтип УР: 4 (8,2 %) и 5 (10,2 %) случаев соответственно. В ходе корреляционного анализа связи между изучаемыми факторами и молекулярными подтипами УР установлено не было (см. табл. 1).

В данной статье представлена оценка первичной конечной точки в зависимости от молекулярного подтипа УР, определенного после ТУРМП (БРВ₁) и РЦЭ (БРВ₂). Результаты анализа продемонстрировали, что 5-летняя БРВ₁ между выявленными подтипами УР не различалась (*log-rank*-тест; *p* = 0,85). При подтипе UroA этот показатель составил 56,3 % (95 % ДИ 14,7–84,2), при UroB – 55,6 % (95 % ДИ 20,4–80,5), при Basal – 66,7 % (95 % ДИ 5,4–94,5), при GU – 63,5 % (95 % ДИ 28,4–84,8). При этом медиана БРВ₁

для подтипов Basal, UroA и UroB (рис. 1, а) достигнута не была. Также 5-летняя БРВ₂ не различалась между подтипами УР (*log-rank*-тест; $p = 0,95$). В группе UroA этот показатель составил 45,7 % (95 % ДИ 6,9–79,5), в группе UroB – 66,7 % (95 % ДИ 28,2–87,8), в группе Basal – 50 % (95 % ДИ 0,6–91,0), в группе GU – 55,4 % (95 % ДИ 21,3–79,8) (рис. 1, б).

Аналогично после ТУРМП (ОВ₁) и РЦЭ (ОВ₂) определена ОВ. Результаты исследования продемонстрировали, что 5-летняя ОВ₁ не различалась между подтипами УР (*log-rank*-тест; $p = 0,94$). При подтипе UroA этот показатель составил 60 % (95 % ДИ 12,6–88,2), при Basal – 50 % (95 % ДИ 0,6–91,0), при GU – 56,4 % (95 % ДИ 24,4–79,3); при UroB отмечена 100 % ле-

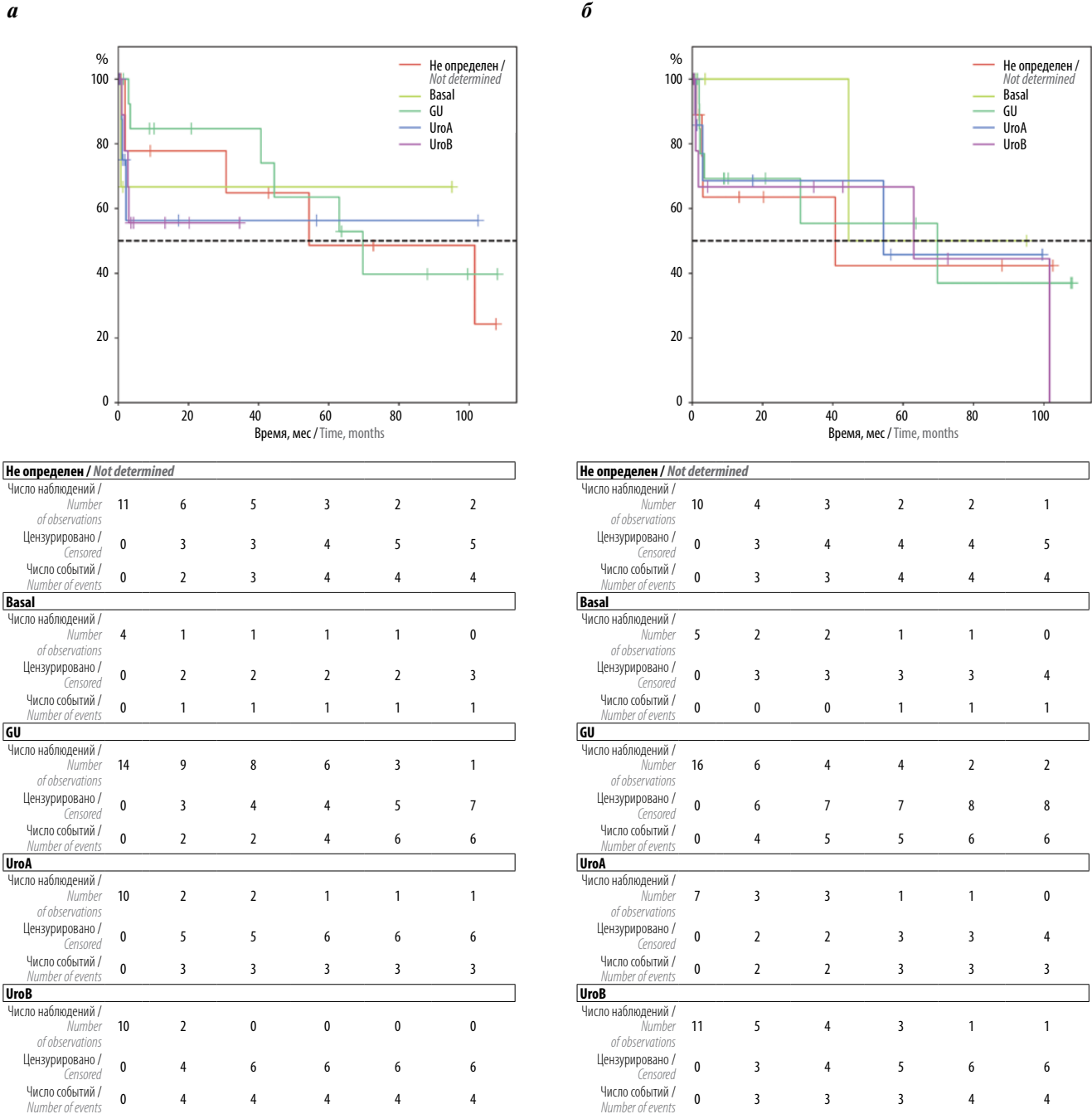


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость в зависимости от варианта молекулярного подтипа уротелиального рака, определенного после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря (а) и радикальной цистэктомии (б). UroA – люминальный А подтип; UroB – люминальный В подтип; Basal – базальный подтип; GU – геномно нестабильный подтип

Fig. 1. Recurrence-free survival depending on urothelial carcinoma subtype determined using material after transurethral resection of bladder tumor (a) and after radical cystectomy (b). UroA – luminal A subtype; UroB – luminal B subtype; Basal – basal subtype; GU – genomically unstable subtype

тальность (рис. 2, а). В ходе анализа 5-летней ОВ₂ не выявлено достоверных различий между подтипами УР (*log-rank*-тест; $p = 0,92$). Наибольшая 5-летняя ОВ₂ установлена в группе UroB (71,4 %; 95 % ДИ 25,8–92,0), наименьшая – в группе UroA (33,3 %; 95 % ДИ 1,4–75,5) (рис. 2, б).

Результаты многофакторного регрессионного анализа показали, что наиболее значимыми предикторами

рецидива УР после радикального лечения являются клиническая стадия ПИА ($p = 0,017$) и патоморфологическая стадия II ($p = 0,021$) (рис. 3). Существенное влияние на показатели ОВ оказывали патоморфологические стадии ПИА ($p = 0,003$) и IVA ($p = 0,019$) (рис. 4). Важно отметить, что ни один из молекулярных подтипов УР, определенных ИГХ-методом, не влиял на БРВ и ОВ (табл. 2).

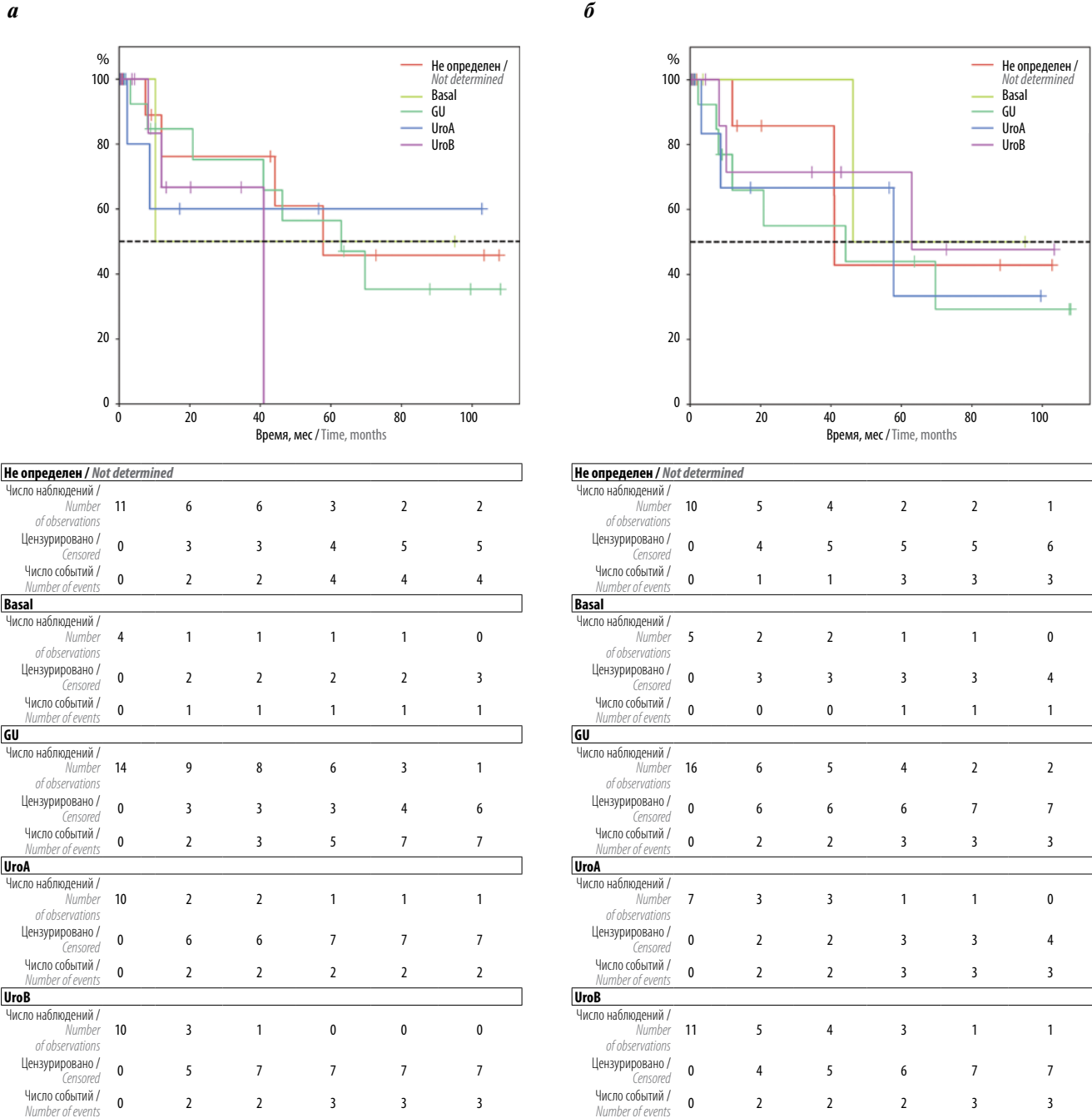


Рис. 2. Общая выживаемость в зависимости от варианта молекулярного подтипа уротелиального рака, определенного на материале после трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря (а) и радикальной цистэктомии (б). UroA – люминальный А подтип; UroB – люминальный В подтип; Basal – базальный подтип; GU – геномно нестабильный подтип

Fig. 2. Overall survival depending on urothelial carcinoma subtype determined using material after transurethral resection of bladder tumor (a) and after radical cystectomy (б). UroA – luminal A subtype; UroB – luminal B subtype; Basal – basal subtype; GU – genomically unstable subtype

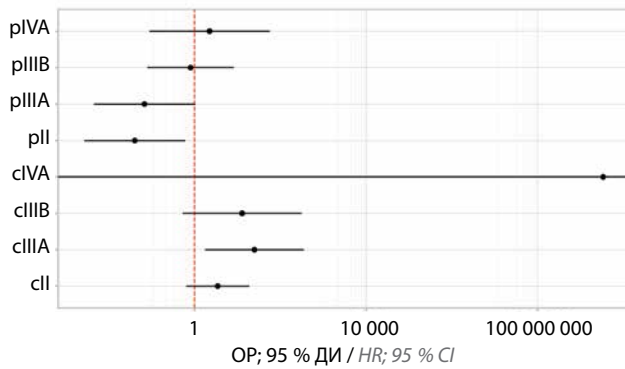


Рис. 3. Влияние клинической (с) и патоморфологической (р) стадий заболевания по классификации American Joint Committee on Cancer 8-го издания на риск развития рецидива рака мочевого пузыря после радикального хирургического вмешательства. ДИ – доверительный интервал; ОР – отношение рисков

Fig. 3. Effect of clinical (c) and pathomorphological (p) disease stages per the American Joint Committee on Cancer classification, 8th edition, on the risk of bladder cancer recurrence after radical surgical intervention. CI – confidence interval; HR – hazard ratio

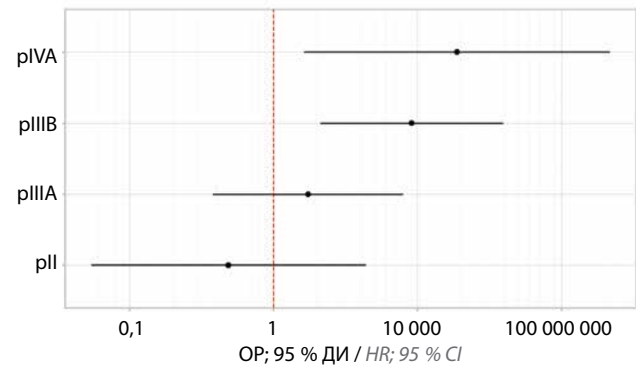


Рис. 4. Влияние патоморфологической стадии заболевания по классификации American Joint Committee on Cancer 8-го издания на риск летального исхода (влияние клинической стадии не установлено). ДИ – доверительный интервал; ОР – отношение рисков

Fig. 4. Effect of pathomorphological disease stage per the American Joint Committee on Cancer classification, 8th edition, on the risk of death (the effect of clinical stage was not observed). CI – confidence interval; HR – hazard ratio

Таблица 2. Результаты факторного анализа влияния стадии заболевания на риск возникновения рецидива и летального исхода

Table 2. Results of factor analysis of the effect of disease stage on the risks of recurrence and death

Фактор риска Risk factor	Однофакторный анализ Univariate analysis		Многофакторный анализ Multivariate analysis	
	ОР; 95 % ДИ HR; 95 % CI	<i>p</i>	ОР; 95 % ДИ HR; 95 % CI	<i>p</i>
Оценка риска рецидива рака мочевого пузыря Evaluation of bladder cancer recurrence risk				
Клиническая стадия IIIA Clinical stage IIIA	2,7; 0,8–10,12	0,123	25,0; 1,80–352,80	0,017*
Патоморфологическая стадия: Pathomorphological stage:				
II	0,53; 0,16–1,81	0,318	0,04; 0–0,60	0,021*
IIIB	3,67; 1,33–10,16	0,012*	0,8; 0,08–8,30	0,860
IVA	10,77; 1,03–112,28	0,047*	2,2; 0,09–56,70	0,625
Оценка риска смертности при раке мочевого пузыря после радикальной цистэктомии Evaluation of the risk of death in bladder cancer after radical cystectomy				
Патоморфологическая стадия: Pathomorphological stage:				
IIIB	9,11; 2,12–39,28	0,003*	9,11; 2,12–39,27	0,003*
IVA	18,79; 1,63–217,26	0,019*	18,79; 1,63–217,26	0,019*

*Влияние предиктора статистически значимо ($p < 0,05$).

Примечание. ОР – относительный риск; ДИ – доверительный интервал.

*Predictor effect is statistically significant ($p < 0.05$).

Note. HR – hazard ratio; CI – confidence interval.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря представляет собой высокогетерогенную опухоль с непостоянной и часто аномальной экспрессией белков – маркеров терминальной дифференцировки, что указывает на псевдодифференцировку [10]. Это может объяснять систематические несоответствия при классификации подтипов РМП с использованием профилирования мРНК и ИГХ-анализа на уровне опухолевых клеток [11]. Тем не менее

постоянно предпринимаются попытки адаптировать определение молекулярного подтипа этой опухоли именно с помощью рутинного ИГХ-исследования [12–14].

В мировой научной литературе представлены 4 основные классификации уротелиальных карцином: Атласа ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA), Лундского университета, Университета Северной Каролины, Онкологического центра им. М.Д. Андерсона.

В связи с разнообразием классификаций в 2019 г. принято соглашение (консенсус) относительно подтипов уротелиального РМП: решено использовать термин «базальный/плоскоклеточно-подобный подтип» (basal-squamous-like, BASQ) для обозначения опухолей, проявляющих фенотип $KRT5/6^+KRT14^+FOXA1-GATA3^-$. Это отражает тот факт, что в данной группе имеется экспрессия базальных кератинов, а также опухоль проявляет признаки плоскоклеточной дифференцировки. Дополнительно предложено изменить название ранее определенного подтипа РМП с «уробазального» на «уротелиоподобный» (сокращенно Uro) [2].

Важной клинической задачей молекулярного профилирования является выбор тактики лечения. Согласно консенсусу по УР 2019 г. в 69 % случаев РМП есть потенциально действующие терапевтические мишени, которые ассоциируются с конкретными молекулярными подтипами [2, 15]. Так, например не во всех случаях мышечно-инвазивный РМП одинаково отвечает на неoadъювантное лечение. По результатам исследования R. Seiler и соавт., люминальные опухоли демонстрируют высокие показатели ОВ как при использовании неoadъювантной химиотерапии, так и без нее [16]. В то же время при базальном РМЖ применение неoadъювантной химиотерапии значительно улучшает показатели ОВ по сравнению с только хирургическим вмешательством [16]. В то же время W. Choi и соавт. в ходе исследования различных подтипов РМП выявили, что опухолевые клетки с мутацией p53 (базально-плоскоклеточный, нейроэндокриноподобный и в меньшей степени геномно нестабильный РМП, согласно консенсусу по УР 2019 г., обладают устойчивостью к химиотерапии [2, 17]. Также обнаружено, что при люминальном подтипе отмечается высокая экспрессия лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-L1), STLA-4 и других иммунных сигналов. В частности, продемонстрирован значимый эффект от лечения ингибиторами контрольных иммунных точек (анти-PD-L1 и анти-PD-1) именно для этой подгруппы пациентов [18]. Таким образом, определение молекулярного подтипа УР в дополнение к гистологическому заключению поможет выбрать оптимальную лекарственную терапию для пациентов с данной патологией.

V. Dadhania и соавт. на основе определения экспрессии двух антител — к CK5/6 и GATA3 — предложили выделять 2 молекулярных подтипа: базальный — с положительной экспрессией CK5/6 и отрицательной экспрессией GATA3, и люминальный — с отрицательной экспрессией CK5/6 и положительной экспрессией GATA3 [6]. A. Hodgson и соавт. выполнили ИГХ-исследование 207 образцов МИРМП с использованием антител к CK5/6 и GATA3 и выделили 85,2 % люминальных ($CK5/6^-/GATA3^+$) и 14,8 % базальных ($CK5/6^+/GATA3^-$) опухолей [19]. Кроме того, удалось установить, что опухоли $CK5/6^+/GATA3^-$ ассоциированы со снижением показателей опухоль-специфической выживаемости

и повышением экспрессии PD-1/PD-L1 [19] (PD-1 — рецептор программируемой гибели 1). По данным T. Vejananda и соавт., удалось выявить значительную связь между выживаемостью и экспрессией GATA3 и CK5/6 [20]. Если опухоли характеризовались только экспрессией GATA3, то они считались люминальными, если только экспрессией CK5/6 — базальными. Также удалось выявить двойной отрицательный подтип, на который указывает отрицательное окрашивание обоих маркеров. В этом случае ожидаются плохие показатели опухоль-специфической выживаемости. Другие комбинации, о которых сообщалось в предыдущих исследованиях (экспрессия CK20 и CK5/6 или CK20 и CK14), не продемонстрировали значимого влияния на выделение молекулярных подтипов [20].

A. Kamoun и соавт. предложили дальнейшую субклассификацию молекулярных подтипов РМП на основе экспрессии p16 и FGFR3 и гистоморфологии опухоли [2]. Авторы выявили, что люминальный папиллярный подтип характеризуется отрицательной экспрессией p16, положительной экспрессией FGFR3 и папиллярной конфигурацией, тогда как люминальный неутонченный подтип — положительной экспрессией p16, отрицательной экспрессией FGFR3 и солидной мышечно-инвазивной формой. Кроме того, ряд исследователей выделили небольшую группу $CK5/6^+p16^+$ -опухолей (до 7 %) с высоким уровнем плоскоклеточной дифференцировки, для которых отмечены частые рецидивы (до 75 % случаев) в период наблюдения до 2 лет. Для данного подтипа характерна экспрессия CK5/6 не только в базальных, но и в промежуточных слоях уротелия, а также экспрессия CK14 в единичных клетках базального слоя, что отсутствует в опухолях уротелиоподобного (люминального папиллярного) подтипа [8]. В отличие от уротелиоподобного подтипа РМЖ уровень экспрессии p16 при базальном подтипе также существенно выше. Подобные дивергенции даже внутри одного подтипа и обширное молекулярное перекрытие опухолей крайне затрудняют внедрение ИГХ-метода и молекулярного профилирования в рутинную практику патологоанатома. Кроме того, вышеуказанные методы сопряжены с высокими затратами.

Для ИГХ-исследования мы использовали расширенную панель из базальных и люминальных антител для выделения 4 молекулярных подтипов РМП: UroA, UroB, Basal и GU. Однако мы не определяли отдельно экспрессию FGFR, и, возможно, именно этот факт не позволил выявить люминальный подтип опухоли у ряда пациентов (после ТУРМП подтип не установлен в 22,4 % случаев, после РЦЭ — в 20,4 %). Результаты анализа показали, что 5-летняя БРВ не различалась между подтипами УР: при UroA она составила 56,3 %, при UroB — 55,6 %, при Basal — 66,7 %, при GU — 63,5 %. Также не было выявлено различий в 5-летней ОВ между подтипами: при UroA она оказалась равной 60 %, при Basal — 50 %, при GU — 56,4 %. При UroB

летальность составила 100 %. Результаты многофакторного регрессионного анализа продемонстрировали, что наиболее значимым предиктором рецидива УР после радикального лечения остается определение клинической или патоморфологической стадии с учетом стадирования по классификации Tumor, Nodus and Metastasis. Таким образом, в данной работе молекулярные подтипы УР, определенные ИГХ-методом с помощью расширенной панели, не влияли на показатели БРВ и ОВ.

Ограничениями нашего исследования были небольшой размер выборки, ретроспективный характер работы и отсутствие профилирования экспрессии генов для проверки соответствия между молекулярными подтипами и экспрессией маркеров ИГХ. Кроме того, только 5–6 % наших пациентов получали нео- и/или адьювантную лекарственную терапию, что могло существенно повлиять на показатели выживаемости,

поскольку эффективность лечения напрямую зависит от молекулярного подтипа опухоли. Также это исследование проведено только в одном центре, поэтому необходима валидация панели на данных из нескольких центров и разных групп населения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение молекулярного подтипа УР с использованием суррогатной панели из 13 маркеров методом полуколичественного расчета гистохимического индекса не продемонстрировало эффективности и прогностической значимости. Выделенные нами 4 подтипа УР не влияли на продолжительность ОВ и БРВ. Необходимо продолжить исследования в данном направлении для выявления наиболее эффективных антител или их комбинаций, которые пройдут валидацию на более крупных выборках биологических образцов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bladder cancer fact sheet. International Agency for Research on Cancer, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
- Kamoun A., de Reyniès A., Allory Y. et al. A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2020;77(4):420–33. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.09.006
- Choi W., Porten S., Kim S. et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25(2):152–65. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.009
- Netto G.J., Amin M.B., Berney D.M. et al. The 2022 World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs—part B: Prostate and urinary tract tumors. *Eur Urol* 2022;82(5):469–82. DOI: 10.1016/j.eururo.2022.07.002
- Tan T.Z., Rouanne M., Tan K.T. et al. Molecular subtypes of urothelial bladder cancer: results from a meta-cohort analysis of 2411 tumors. *Eur Urol* 2019;75(3):423–32. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.08.027
- Dadhania V., Zhang M., Zhang L. et al. Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine* 2016;12:105–17. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.036
- Guo C.C., Bondaruk J., Yao H. et al. Assessment of luminal and basal phenotypes in bladder cancer. *Sci Rep* 2020;10(1):9743. DOI: 10.1038/s41598-020-66747-7
- Мещеряков И.А., Крюков К.А., Митин Н.П. и др. Молекулярные подтипы уротелиальных карцином мочевого пузыря у пациентов молодого возраста. *Journal of Siberian Medical Sciences* 2021;3:82–104. Meshcheryakov I.A., Kryukov K.A., Mitin N.P. et al. Molecular subtypes of urothelial carcinomas of the bladder in young patients. *Journal of Siberian Medical Sciences* 2021;3:82–104. (In Russ.).
- Sanguedolce F., Zanelli M., Palicelli A. et al. Are we ready to implement molecular subtyping of bladder cancer in clinical practice? Part 1: general issues and marker expression. *Int J Mol Sci* 2022;23(14):7819. DOI: 10.3390/ijms23147819
- Sjödahl G., Eriksson P., Liedberg F., Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: Global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J Pathol* 2017; 242(1):113–25. DOI: 10.1002/path.4886
- Goutas D., Palamaris K., Stofas A. et al. Immunohistochemical study of bladder cancer molecular subtypes and their association with PD-L1 expression. *Cancers (Basel)* 2022;15(1):188. DOI: 10.3390/cancers15010188
- Wang C.-C., Tsai Y.-C., Jeng Y.-M. Biological significance of GATA3, cytokeratin 20, cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer. *PLoS ONE* 2019;14(8):e0221785. DOI: 10.1371/journal.pone.0221785
- Calvete J. et al. The coexpression of fibroblast activation protein (FAP) and basal-type markers (CK 5/6 and CD44) predicts prognosis in high-grade invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Hum Pathol* 2019;91:61–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.07.002
- Akhtar M., Rashid S., Gashir M.B. et al. CK20 and CK5/6 immunohistochemical staining of urothelial neoplasms: a perspective. *Adv Urol* 2020;2020:e4920236. DOI: 10.1155/2020/4920236
- Мещеряков И.А., Крюков К.А., Шелехова К.В., Рогачев М.В. Молекулярная классификация уротелиальных карцином мочевого пузыря в патологоанатомической практике: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. 62 с. Meshcheryakov I.A., Kryukov K.A., Shelekhova K.V., Rogachev M.V. Molecular classification of urothelial carcinomas of the bladder in pathoanatomical practice: a textbook for doctors and students in the system of higher and additional professional education. Saint Petersburg: NMIC onkologii im. N.N. Petrova, 2020. 62 p. (In Russ.).
- Seiler R., Ashab H.A.D., Erho N. et al. Impact of molecular subtypes in muscle-invasive bladder cancer on predicting response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Eur Urol* 2017;72(4):544–54. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.03.030
- Choi W., Porten S., Kim S. et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25(2):152–65. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.009
- Rosenberg J.E., Hoffman-Censits J., Powles T. et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with

- platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016;387(10031):1909–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4
19. Hodgson A., Liu S.K., Vesprini D. et al. Basal-subtype bladder tumours show a “hot” immunophenotype. *Histopathology* 2018;73(5):748–57. DOI: 10.1111/his.13696
20. Bejrananda T., Kanjanapradit K., Saetang J. et al. Impact of immunohistochemistry-based subtyping of GATA3, CK20, CK5/6, and CK14 expression on survival after radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Sci Rep* 2021;11:21186. DOI: 10.1038/s41598-021-00628-5

Вклад авторов

М.В. Беркут: статистический анализ данных, написание текста статьи, редактирование;
А.С. Артемьева: разработка концепции и дизайна исследования, определение критериев включения в исследование и исключения из него, анализ и обработка результатов иммуногистохимического исследования;
А.В. Хохлова: проведение иммуногистохимического окрашивания, сбор данных, контроль за качеством и валидацией протоколов окрашивания, анализ и интерпретация результатов иммуногистохимического анализа;
А.Э. Саад: отбор медицинских записей и случаев в соответствии с критериями исследования, систематизация данных;
А.К. Носов: разработка общей концепции и дизайна исследования, определение критериев включения и исключения для когорты, научное редактирование.

Authors' contributions

M.V. Berkut: statistical data analysis, manuscript writing, editing;
A.S. Artemyeva: study concept and design, determination of inclusion and exclusion criteria for the study, analysis and processing of the results of immunohistochemical examination;
A.V. Khokhlova: immunohistochemical staining, data accumulation, quality control and validation of staining protocols, analysis and interpretation of the results of immunohistochemical examination;
A.E. Saad: selection of medical records and cases in accordance with the criteria of the study, systematization of data;
A.K. Nosov: development of the general concept and design of the study, determination of inclusion and exclusion criteria for the cohort, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID authors

М.В. Беркут / M.V. Berkut: <https://orcid.org/0000-0002-6276-1716>
А.С. Артемьева / A.S. Artemyeva: <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>
А.В. Хохлова / A.V. Khokhlova: <https://orcid.org/0000-0002-3976-8805>
А.Э. Саад / A.E. Saad: <https://orcid.org/0000-0003-0445-2277>
А.К. Носов / A.K. Nosov: <https://orcid.org/0000-0003-3850-7109>

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 правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (протокол № 32/355 от 23.12.2020).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 32/355 dated 23.12.2020).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-114-126>

Создание *in vitro* модели для изучения роли дисульфидных связей в составе большого внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках карциномы яичника OVCAR-8

В.С. Скрипова, Д.А. Фирсова, А.В. Килунов, Л.Ф. Булатова, М.А. Попутский, Р.Г. Киямова

Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18, корп. 1

Контакты: Рамзия Галлямовна Киямова kiyatova@mail.ru, Вера Сергеевна Скрипова v.s.scripova@yandex.ru

Введение. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b – перспективная мишень для таргетной противоопухолевой терапии. Его большой внеклеточный домен (ВКД) содержит скрытый эпитоп МХ35, против которого разработаны терапевтические антитела, проходящие доклинические и клинические испытания. Доступность эпитопа МХ35 для антител выше в опухолевых клетках и зависит от конформации ВКД, обусловленной дисульфидными связями между остатками цистеина С303, С322, С328 и С350. Количество этих дисульфидных связей неизвестно, как и то, какие именно остатки цистеина участвуют в поддержании конформации ВКД NaPi2b, возможной регуляции его транспортной активности и стабильности. Выделение и очистка трансмембранных белков, включая NaPi2b, для структурных и функциональных исследований являются трудно разрешимыми задачами, поэтому необходимо разработать *in vitro* модель для изучения особенностей формирования дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, а также определения их роли в обеспечении доступности скрытого эпитопа МХ35 и активности транспортера в живых клетках.

Цель исследования – создание панели клональных сублиний карциномы яичника человека OVCAR-8, содержащих рекомбинантные варианты транспортера NaPi2b дикого типа, а также варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина в области ВКД на остатки аланина.

Материалы и методы. Клетки карциномы яичника OVCAR-8, не экспрессирующие ген транспортера NaPi2b, трансдуцировали лентивирусными частицами, несущими нуклеотидные последовательности, кодирующие транспортер NaPi2b дикого типа или его мутантные варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина С303, С322, С328 и С350 на остатки аланина, для имитации восстановления потенциальных дисульфидных связей между ними. После отбора трансдуцированных клеток получали клональные сублинии, в лизатах которых методами вестерн- и дот-блоттинга оценивали содержание рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b.

Результаты. Получена панель из 9 клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8, содержащих рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа и его мутантные варианты. Отмечено влияние введенных аминокислотных замен на содержание и электрофоретическую подвижность транспортера NaPi2b.

Заключение. Полученная панель клональных сублиний может быть использована в качестве *in vitro* модели для изучения конформации ВКД транспортера NaPi2b, обусловленной дисульфидными связями, что позволит раскрыть механизм образования скрытого эпитопа МХ35 и пролить свет на роль ВКД в регуляции транспортной активности NaPi2b. Понимание механизма образования скрытого эпитопа МХ35 даст возможность найти новые скрытые эпитопы в составе внеклеточных доменов трансмембранных белков, которые могут быть использованы в качестве мишеней для таргетной противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: NaPi2b, SLC34A2, злокачественное новообразование, дисульфидная связь, опухоль-специфический эпитоп, конформация

Для цитирования: Скрипова В.С., Фирсова Д.А., Килунов А.В. и др. Создание *in vitro* модели для изучения роли дисульфидных связей в составе большого внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клетках карциномы яичника OVCAR-8. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(4):114–26.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-114-126>

Development of an *in vitro* model to study the role of disulfide bonds in the largest extracellular domain of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b in OVCAR-8 ovarian carcinoma cells

V.S. Skripova, D.A. Firsova, A.V. Kilunov, L.F. Bulatova, M.A. Poputsky, R.G. Kiyamova

Research Laboratory "Biomarker", Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; Bld. 1, 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia

Contacts: Ramziya Gallyamovna Kiyamova kiyamova@mail.ru, Vera Sergeevna Skripova v.s.skripova@yandex.ru

Introduction. The sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b is a promising target for targeted antitumor therapy. There is the largest extracellular domain (ECD) containing a cryptic MX35 epitope, against which therapeutic antibodies have been developed and are undergoing preclinical and clinical trials. The accessibility of the MX35 epitope to antibodies is higher in tumor cells and depends on the conformation of the ECD, determined by disulfide bonds between cysteine residues C303, C322, C328 and C350. The number of these disulfide bonds and cysteine residues that participate in the NaPi2b ECD conformation maintaining, regulation of its transport activity and stability is unknown. Isolation and purification of transmembrane proteins, including NaPi2b, for structural and functional studies is difficult, therefore it is necessary to develop an *in vitro* model to study the formation of disulfide bonds in the ECD region of the NaPi2b transporter and their role in ensuring the availability of the cryptic MX35 epitope and transporter activity in living cells.

Aim. To create a panel of clonal sublines of human ovarian carcinoma OVCAR-8 containing recombinant variants of the wild-type NaPi2b transporter, as well as with single and double substitutions of cysteine residues in the ECD region with alanine residues.

Materials and methods. OVCAR-8 ovarian carcinoma cells that do not express the NaPi2b transporter gene were transduced with lentiviral particles carrying nucleotide sequences encoding the wild-type NaPi2b transporter or its mutant variants with single and double substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues to simulate reduction of potential disulfide bonds between them. After selecting transduced cells, clonal sublines were obtained, in the lysates of which the content of recombinant variants of the NaPi2b transporter was assessed using Western blot analysis and dot blot analysis.

Results. A panel of 9 clonal sublines of OVCAR-8 ovarian carcinoma containing the wild-type recombinant NaPi2b transporter and its mutant variants was obtained. The effect of the introduced amino acid substitutions on the content and electrophoretic mobility of the NaPi2b transporter was noted.

Conclusion. The resulting panel of clonal sublines can be used as an *in vitro* model to study the conformation of the ECD transporter NaPi2b, determined by disulfide bonds, which will reveal the mechanism of formation of the cryptic MX35 epitope and shed light on the role of ECD in the regulation of NaPi2b transport activity. Understanding the mechanism of formation of the cryptic MX35 epitope will make it possible to find new cryptic epitopes in the extracellular domains of transmembrane proteins, which can be used as targets for antitumor therapy.

Keywords: NaPi2b, *SLC34A2*, malignancy, disulfid bond, tumor-specific epitope, conformation

For citation: Skripova V.S., Firsova D.A., Kilunov A.V. et al. Development of an *in vitro* model to study the role of disulfide bonds in the largest extracellular domain of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b in OVCAR-8 ovarian carcinoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2024;11(4):114–26. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-4-114-126>

ВВЕДЕНИЕ

Одной из приоритетных задач современной онкологии является разработка новых терапевтических подходов, обладающих высокой эффективностью и низкой токсичностью. К ним относится таргетная терапия лекарственными препаратами, направленными против конкретных молекулярных мишеней, характерных преимущественно для опухолевых клеток. Поиск таких опухоль-специфических мишеней является непростой задачей, поскольку большинство белков клеток опухоли представлены и в клетках нормальных тканей, что увеличивает риск их повреждения при введении таргетной терапии.

Примером перспективных опухоль-специфических мишеней является мембранный гликопротеин – натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b из семейства транспортеров SLC34, который участвует

в поддержании фосфатного гомеостаза [1, 2]. Экспрессия гена *SLC34A2*, кодирующего транспортер NaPi2b у человека, выявлена в клетках ряда нормальных тканей [3–5], а повышенный уровень его экспрессии – в клетках некоторых злокачественных новообразований, включая рак яичника, легкого, щитовидной железы и др. [5–13].

Транспортер NaPi2b идентифицирован в качестве мишени для моноклональных антител MX35 [14–16], их терапевтических производных и аналогов [17–20] с помощью модифицированного подхода SEREX (serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries) [21–23]. Показано, что эпитоп для вышеописанных антител (эпитоп MX35) находится в составе большого внеклеточного домена (ВКД 188–361 а.о.) транспортера NaPi2b на участке 311–340 а.о. [15, 16]. Особенностью данных антител является то, что при

введении в организм *in vivo* они накапливаются преимущественно в очагах карциномы яичника, а не в клетках нормальных тканей, в которых экспрессируется ген транспортера NaPi2b [24, 25]. Это может говорить об опухоли-специфической природе эпитопа MX35 в молекуле транспортера NaPi2b. Следует отметить, что в этой же области ВКД находятся 4 остатка цистеина — С303, С322, С328 и С350, а также несколько потенциальных сайтов для N-гликозилирования [15]. Результаты наших исследований и работ других авторов показали, что при восстановлении дисульфидных связей в условиях *in vitro* эффективность связывания антител с эпитопом MX35 значительно снижалась в лизатах клеток эукариот, но не изменялась для синтетических пептидов [15], и в лизатах клеток прокариот, в которых отсутствует гликозилирование, в условиях вестерн-блоттинга [26].

Мы предполагаем, что эпитоп MX35 является скрытым эпитопом, а его доступность для распознавания антителами зависит от конформации ВКД транспортера NaPi2b, обусловленной дисульфидными связями и N-гликозилированием [27–29]. На данный момент структура транспортера NaPi2b экспериментально не разрешена, поэтому остается неизвестным, сколько и между какими именно остатками цистеина в области его ВКД образуются дисульфидные связи, от которых зависит доступность эпитопа MX35 для распознавания антителами. На сегодняшний день с помощью экспериментальных и *in silico* подходов, включая анализ структуры транспортера NaPi2b из базы структур белков AlphaFold, предсказана возможность образования дисульфидных связей между остатками цистеина С303–С350 и С322–С328 [15, 26].

В связи со сложностью проведения структурных исследований трансмембранных белков, в том числе NaPi2b, для анализа дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b необходимо использовать другие методы и подходы, включая *in vitro* модели для исследования транспортера в условиях, позволяющих сохранять его нативную конформацию, — на живых клетках.

Цель исследования — путем лентивирусной трансдукции получить панель клональных сублиний карциномы яичника человека OVCAR-8, синтезирующих рекомбинантный натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b дикого типа и его мутантные варианты, в которых каждый из остатков цистеина в области ВКД в положениях С303, С322, С328, С350 или одновременно 2 из них, а именно С303 и С322, С303 и С328, С322 и С328, заменены на остатки аланина. С помощью такой клеточной панели могут быть изучены особенности образования дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, от которых зависит доступность скрытого эпитопа MX35 для антител (в частности, определено, между какими именно остатками цистеина они образуются), а также их влияние на функциональную активность, конформацию и топологию транспортера NaPi2b.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Клеточную линию почки эмбриона человека НЕК293Т (ATCC, США) использовали для создания лентивирусных частиц. Клеточную линию карциномы яичника человека OVCAR-8, в которой отсутствует эндогенная экспрессия гена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b [30, 31], — для получения панели клональных сублиний, содержащих рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа, а также его варианты с одиночными и двойными заменами остатков цистеина в положениях С303, С322, С328 и С350 на остатки аланина.

Культивирование клеточных линий. Клеточную линию НЕК293Т культивировали в полной питательной среде DMEM («Панэко», Россия) с содержанием 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Cargicorn, Германия), 2 мМ L-аланил-L-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Клеточную линию OVCAR-8 культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 («Панэко», Россия), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Cargicorn, Германия), 2 мМ L-аланил-L-глутамин («Панэко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина («Панэко», Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина («Панэко», Россия). Сублинии OVCAR-8, трансдуцированные лентивирусными частицами, полученными на основе вектора pLV-CMV-H4-пуго, культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 («Панэко», Россия) в присутствии 1 мкг/мл пурамицина (Gibco, США).

Получение рекомбинантных лентивирусных векторов. Вектор pcDNA3.1(+)/NaPi2b, кодирующий транспортер NaPi2b дикого типа, полученный нами ранее, использовали в качестве матрицы для выделения плазмид, кодирующих мутантные варианты транспортера NaPi2b с одиночными и двойными заменами остатков цистеина С303, С322, С328 и С350 на остатки аланина [32], методом сайт-направленного мутагенеза с помощью набора реактивов QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, США) по инструкции производителя. Наличие целевых мутаций в плаزمиде после мутагенеза подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Из выделенных плазмид с помощью рестриктаз EcoRI (Thermo Fisher Scientific, США) и BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) получены нуклеотидные последовательности, кодирующие мутантные варианты транспортера NaPi2b, с последующим клонированием в лентивирусный вектор pLV-CMV-H4-пуго [33] по сайтам рестрикции EcoRI и BamHI. Амплификацию рекомбинантных лентивирусных векторов проводили в клетках *E. coli* XL1-Blue с последующим выделением и очисткой с помощью набора Plasmid MiniPrep («Евроген», Россия).

Лентивирусная трансдукция клеток млекопитающих. Лентивирусные частицы получали в клетках НЕК293Т путем трансфекции упаковочными плазмидами

psPAX2 (Addgene #12260) и pMD2.G (Addgene #12259) и рекомбинантными векторами pLV-CMV-H4-puro, кодирующими мутантные варианты транспортера NaPi2b. Трансфекцию проводили с помощью полиэтиленimina (Thermo Fisher Scientific, США), как описано ранее [34]. Трансдукцию клеток карциномы яичника OVCAR-8 полученными лентивирусными частицами также выполняли, как описано ранее [35]. Для отбора трансдуцированных клеток через 48 ч после трансдукции добавляли питательную среду, содержащую селективный антибиотик пурамицин в концентрации 1 мкг/мл.

Получение клональных сублиний. Клональные сублинии получали методом редкого посева. В 96-луночный планшет рассеивали по 100 мкл суспензии клеток с концентрацией 5 кл/мл и добавляли 100 мкл полной питательной среды. В каждом случае использовали от 2 до 4 96-луночных планшетов. С помощью светового микроскопа находили и отмечали лунки, где образовались клональные популяции клеток, которые наращивали для дальнейшей работы.

Вестерн-блоттинг. Клетки рассеивали в лунки 6-луночного планшета и культивировали до достижения 80 % конфлюэнтности. Клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и лизировали в 100 мкл буфера RIPA (Thermo Fisher Scientific, США), содержащего смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты центрифугировали при 10 тыс. об/мин при +4 °C в течение 30 мин. Растворимую белковую фракцию собирали и использовали в качестве образцов для проведения электрофореза в денатурирующих условиях в 10 % полиакриламидном геле. Вестерн-блоттинг проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител кролика против N-концевого домена транспортера NaPi2b (CST, США) и GAPDH

(Thermo Fisher Scientific, США). В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения хемилюминисцентного сигнала использовали субстраты для пероксидазы хрена SuperSignal™ West Pico PLUS и Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, США). Детекцию сигнала проводили с использованием системы геле-документирования ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Дот-блоттинг. Образцы клеточных лизатов готовили аналогично образцам для вестерн-блоттинга. На нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) наносили объем образцов клеточных лизатов, в котором содержалось 5 мкг общего белка. После высушивания мембраны обрабатывали и анализировали так же, как для вестерн-блоттинга, в соответствии с рекомендациями производителя антител против N-концевого домена транспортера NaPi2b (CST, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом молекулярного клонирования получены рекомбинантные лентивирусные экспрессионные векторы pLV-CMV-H4-puro с нуклеотидными последовательностями, кодирующими транспортер NaPi2b дикого типа, его мутантные варианты с одиночными заменами остатков цистеина на остатки аланина в положениях 303, 322, 328 и 350, а также с заменами одновременно двух из них: C303 и C322, C303 и C328, C322 и C328. Наличие целевых последовательностей в полученных рекомбинантных векторах подтверждено с помощью рестрикции очищенных из бактериальных клеток рекомбинантных векторов ферментами EcoRI и BamHI. Во всех случаях наблюдали наличие фрагмента ДНК длиной примерно 2100 п.о., что соответствовало ожидаемым результатам (рис. 1).

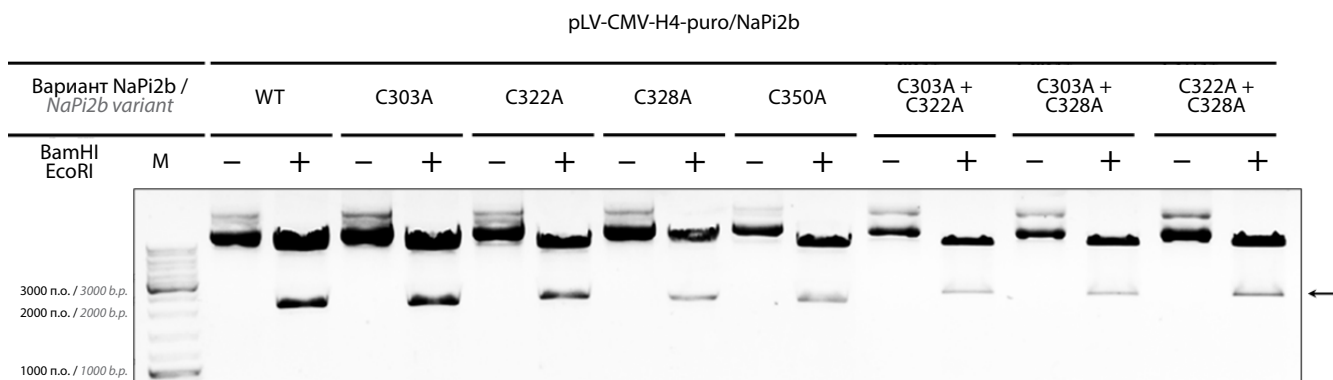


Рис. 1. Результаты горизонтального электрофореза в агарозном геле продуктов рестрикции эндонуклеазами BamHI и EcoRI рекомбинантных лентивирусных векторов pLV-CMV-H4-puro после клонирования последовательностей, кодирующих рекомбинантные варианты натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с одиночными и двойными аминокислотными заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина. M – маркер длин ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США); н.о. – пары оснований; WT – дикий тип. Стрелкой указаны последовательности ДНК, кодирующие транспортер NaPi2b (~2100 н.о.)

Fig. 1. Results of the horizontal agarose gel electrophoresis of recombinant lentiviral vectors pLV-CMV-H4-puro products of restriction by BamHI and EcoRI after cloning sequences encoding recombinant variants of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with single and double amino acid substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 to alanine residues results. M – GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, США); b.p. – base pair; WT – wild-type. Arrow is showing DNA sequences encoding NaPi2b transporter (~2100 b.p.)

Таблица 1. Характеристика сублиний карциномы яичника OVCAR-8, полученных после лентивирусной трансдукции

Table 1. Characteristics of OVCAR-8 ovarian carcinoma sublines after lentiviral transduction

Сублиния Subline	Вариант рекомбинантного транспортера NaPi2b, содержащийся в сублинии The recombinant NaPi2b transporter variant contained in the subline
OVCAR-8/NaPi2b-wt	Дикого типа Wild-type
OVCAR-8/NaPi2b-C303A	С аминокислотной заменой C303A With C303A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C322A	С аминокислотной заменой C322A With C322A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C328A	С аминокислотной заменой C328A With C328A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C350A	С аминокислотной заменой C350A With C350A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A	С аминокислотными заменами C303A и C322A With C303A and C322A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A	С аминокислотными заменами C303A и C328A With C303A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A	С аминокислотными заменами C322A и C328A With C322A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/empty	Не содержащий NaPi2b Without NaPi2b

На основе полученных векторов созданы лентивирусные частицы, которыми трансдуцировали клетки карциномы яичника человека OVCAR-8. Для использования в качестве отрицательного контроля клетки OVCAR-8 трансдуцировали лентивирусными частицами, полученными на основе пустого вектора pLV-CMV-H4-riго, не содержащего последовательность, кодирующую транспортер NaPi2b. Такой контроль может быть использован в том числе для подтверждения специфичности антител против транспортера NaPi2b, а также при необходимости для учета влияния процесса трансдукции на физиологию клеток при дальнейших исследованиях.

В результате отбора с использованием пурамицина (1 мкг/мл) получены устойчивые к нему популяции клеток OVCAR-8, что говорит об их успешной трансдукции. В каждом случае количество трансдуцированных клеток, выживших в присутствии пурамицина, не различалось, что говорит об одинаковой эффективности трансдукции. Перечень полученных сублиний и их характеристика представлены в табл. 1.

С помощью вестерн-блоттинга лизатов трансдуцированных клеток OVCAR-8 проанализировано содержание каждого рекомбинантного варианта транспортера NaPi2b, которое оценивали по интенсивности специфического хемилюминисцентного сигнала от антител против его N-концевого домена (рис. 2).

Содержание рекомбинантного транспортера NaPi2b в исследуемых образцах в разных вариантах различалось. Высокий уровень его содержания характерен для дикого типа и мутантных вариантов транспортера NaPi2b с аминокислотными заменами C322A и C322A + C328A (см. рис. 2; образцы WT, C322A, C322A + C328A), средний — для мутантных вариантов с аминокислотными заменами C328A и C350A (см. рис. 2; образцы C328A и C350A), низкий — для мутантного варианта транспортера с аминокислотными заменами C303A + C328A (рис. 2; образец C303A + C328A). В случае мутантных вариантов транспортера с аминокислотными заменами C303A и C303A + C322A не наблюдали специфического сигнала, соответствующего транспортеру NaPi2b (см. рис. 2; образцы C303A и C303A + C322A), что может говорить об отсутствии или крайне низком содержании данных мутантных вариантов в исследуемых образцах. Поскольку в каждом случае эффективность трансдукции клеток OVCAR-8 была одинаковой, разницу в уровне содержания различных вариантов транспортера NaPi2b можно объяснить гетерогенностью полученных после трансдукции популяций клеток. Поскольку при лентивирусной трансдукции интеграция экспрессионной кассеты в геном клетки происходит случайно, содержащийся в ней трансген может попадать в области генома с разной доступностью хроматина для транс-

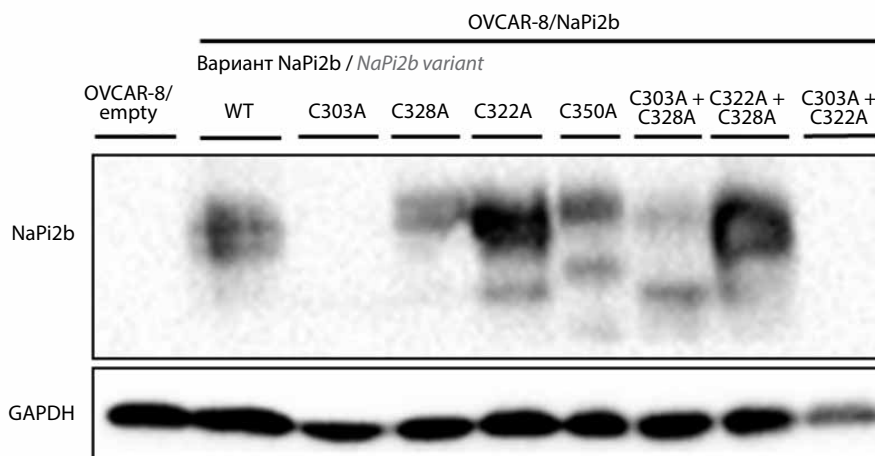


Рис. 2. Результаты анализа содержания рекомбинантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в поликлональных популяциях клеток OVCAR-8 после трансдукции лентивирусными частицами, полученными на основе рекомбинантных лентивирусных векторов pLV-CMV-H4-puro/NaPi2b, кодирующих дикий тип (WT) и мутантные варианты транспортера NaPi2b

Fig. 2. Results of the analysis of recombinant sodium-dependents phosphate transporter NaPi2b variants content in polyclonal OVCAR-8 cell populations after transduction by lentiviral particles based on recombinant lentiviral vectors pLV-CMV-H4-puro/NaPi2b encoding wild-type (WT) and mutant variants of NaPi2b transporter

крипции. Это приводит к формированию поликлональных популяций, в которых уровень экспрессии трансгена может значительно различаться между клетками, что, в свою очередь, влияет на интерпретацию результатов дальнейших исследований. В связи с этим для последующей работы получали клональные сублинии (полученные из одной клетки) трансдуцированных клеток OVCAR-8 (см. табл. 1).

Для отрицательного контроля OVCAR-8/empty, а также для каждого рекомбинантного варианта транспортера NaPi2b получены от 4 до 39 клональных сублиний, среди которых проводили отбор сублиний с высоким содержанием целевых рекомбинантных ва-

риантов транспортера NaPi2b с помощью вестерн-и/или дот-блоттинга.

Для всех пяти полученных клональных сублиний OVCAR-8/empty по результатам вестерн-блоттинга подтверждено отсутствие содержания в клетках рекомбинантного транспортера NaPi2b (рис. 3), а клональная сублиния OVCAR-8/empty/2H7 отобрана для включения в панель клеточных линий в качестве отрицательного контроля. Среди четырех полученных клональных сублиний OVCAR-8/NaPi2b-wt наибольшее содержание целевого белка наблюдалось в клональной сублинии OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11 (см. рис. 3), которая вошла в панель и использовалась в дальнейшей

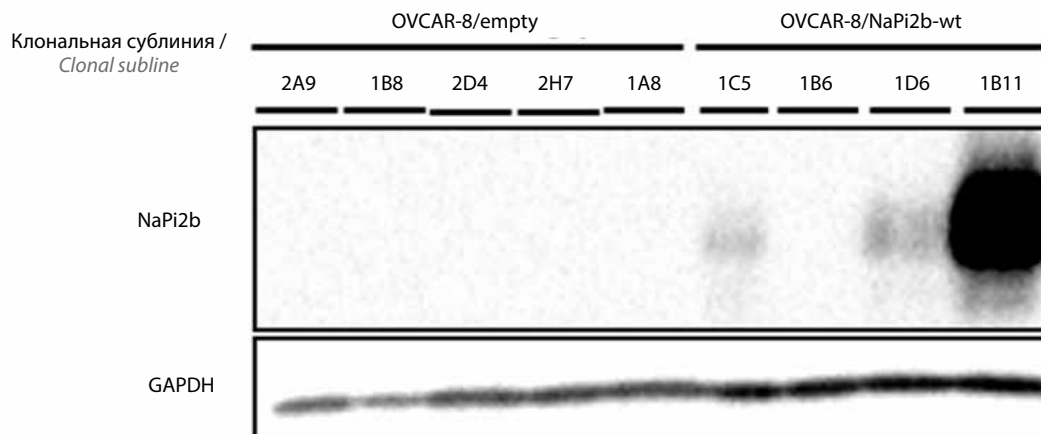


Рис. 3. Результаты анализа содержания рекомбинантного натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b в клональных сублиниях OVCAR-8/empty и OVCAR-8/NaPi2b-wt

Fig. 3. Results of the analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b content in OVCAR-8/empty and OVCAR-8/NaPi2b-wt clonal sublines

работе в качестве положительного контроля содержания транспортера NaPi2b.

Отбор клональных сублиний, содержащих рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (OVCAR-8/NaPi2b-mut), проводили в 2 этапа. На первом этапе клеточные лизаты исследуемых сублиний анализировали методом дот-блоттинга, что позволило выявить от 5 до 30 сублиний, содержащих рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (рис. 4).

Интересно отметить, что для сублиний OVCAR-8/NaPi2b-C303A и OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A выявлены клональные сублинии, содержащие соответствующие рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (см. рис. 4, а, д, табл. 2), несмотря на то, что результаты вестерн-блоттинга лизатов клеток до клональной селекции не выявили в них наличие рекомбинантного транспортера NaPi2b (см. рис. 2; образцы C303A и C303A+C322A).

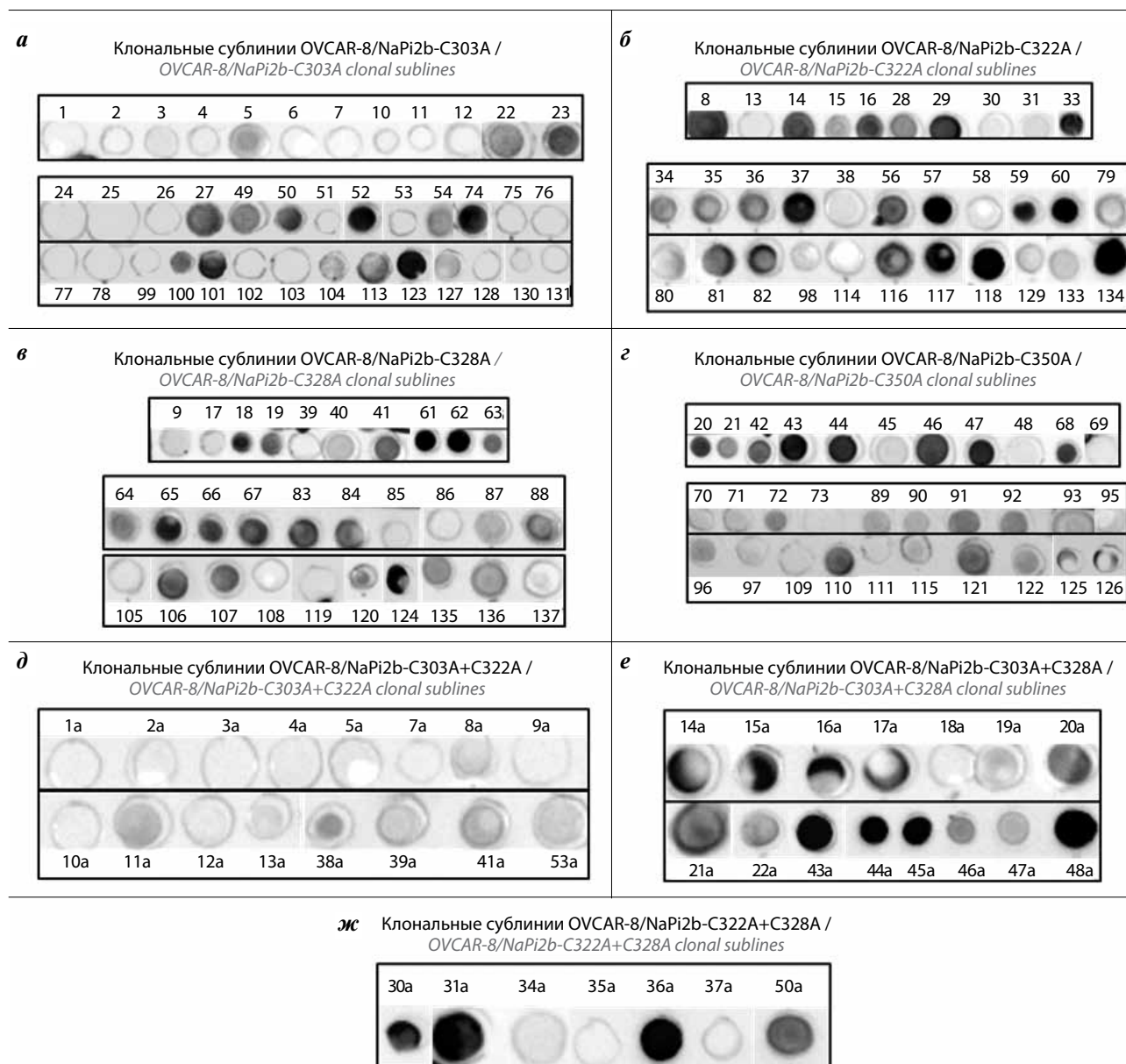


Рис. 4. Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-C303A (а), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A (в), OVCAR-8/NaPi2b-C350A (г), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A (д), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A (е) и OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A (ж)

Fig. 4. Results of the analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with substitution of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-C303A (a), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A (в), OVCAR-8/NaPi2b-C350A (г), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A (д), OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A (е) и OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A (ж)

Таблица 2. Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-mut, полученные с помощью дот-блоттинга

Table 2. Results of the analysis of recombinant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with substitution of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-mut obtained by dot blotting

Сублиния Subline	Номер клональных сублиний, содержащих транспортер NaPi2b Number of the clonal sublines, containing NaPi2b transporter	Количество проанализированных/содержащих NaPi2b клональных сублиний, отобранных для вестерн-блоттинга Amount of analyzed/containing NaPi2b/selected for Western blot analysis clonal sublines
OVCAR-8/NaPi2b-C303A	3, 5, 22, 23, 27, 49, 50, 52, 54, 74, 100, 101, 104, 113, 123, 127	39/16/12
OVCAR-8/NaPi2b-C322A	8, 13, 14, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 56, 57, 59, 60, 79, 80, 81, 82, 98, 116, 117, 118, 129, 133, 134	32/30/4
OVCAR-8/NaPi2b-C328A	9, 17, 18, 19, 40, 41, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 83, 84, 87, 88, 106, 107, 120, 124, 135, 136	30/23/4
OVCAR-8/NaPi2b-C350A	20, 21, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 68, 70, 71, 72, 89, 90, 91, 92, 93, 96, 97, 110, 115, 121, 122, 125, 126	31/26/4
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A	8а, 11а, 13а, 38а, 39а, 41а, 53а	16/7/3
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A	14а, 15а, 16а, 17а, 19а, 20а, 21а, 22а, 43а, 44а, 45а, 46а, 47а, 48а	15/14/2
OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A	30а, 31а, 34а, 36а, 50а	7/5/2

Примечание. Жирным шрифтом выделены сублинии, отобранные для вестерн-блоттинга.
Note. Clonal sublines numbers selected for Western-blot analysis are in bold.

По результатам дот-блоттинга для каждой сублинии OVCAR-8/NaPi2b-mut отобраны от 2 до 12 клональных сублиний (см. табл. 2), в лизатах которых содержание транспортера NaPi2b исследовали методом вестерн-блоттинга. Подтверждено, что в образцах отобранных клональных сублиний OVCAR-8/NaPi2b-mut содержатся соответствующие рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b (рис. 5 и 6).

Содержание всех рекомбинантных мутантных вариантов транспортера NaPi2b как с одиночными, так и с двойными заменами остатков цистеина, во всех исследованных клональных сублиниях OVCAR-8 ниже, чем рекомбинантного транспортера NaPi2b дикого типа (см. рис. 5 и 6). Особенно низкое содержание отмечено для рекомбинантных мутантных вариантов транспортера NaPi2b с заменами C303A (рис. 5а) и C303A+C322A (см. рис. 6; образцы 41а, 53а, 11а). В случае мутантного варианта транспортера NaPi2b с заменой C303A+C322A специфический сигнал удалось детектировать только при более длительной экспозиции (114 с) при регистрации хемилюминисценции (см. рис. 6; образцы 41а, 53а, 11а).

Результаты вестерн-блоттинга показали, что электрофоретическая подвижность транспортера NaPi2b дикого типа (см. рис. 5 и 6; образец К⁺) выше, чем его рекомбинантных мутантных вариантов с заменами C303A (см. рис. 5, а), C322A (рис. 5, б), C328A (рис. 5, в; образцы 18, 62, 61, 65), C350A (рис. 5, в; образцы 43, 44,

46, 47), C303A+C328A (см. рис. 6; образцы 43а и 44а) и C322A+C328A (см. рис. 6; образцы 30а и 31а). Стоит отметить, что для всех рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b наряду с основной гликозилированной формой (100–130 кДа) наблюдается наличие более электрофоретически подвижной дегликозилированной формы на уровне около 75 кДа, что особенно заметно для транспортера NaPi2b с двойными аминокислотными заменами C303A+C328A (см. рис. 6; образцы 43а и 44а) и C322A+C328A (см. рис. 6; образцы 30а и 31а). В случае двойной аминокислотной замены C303A+C322A при длительной экспозиции удалось детектировать только дегликозилированную форму транспортера NaPi2b на уровне 75 кДа (см. рис. 6, образцы 41а, 53а, 11а).

Проведенный анализ позволил отобрать клональные сублинии карциномы яичника OVCAR-8/NaPi2b-mut, содержащие рекомбинантные мутантные варианты транспортера NaPi2b, для включения в клеточную панель (табл. 3).

Таким образом, получена панель клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8, содержащих рекомбинантные варианты транспортера NaPi2b, включая дикий тип и мутантные варианты с одиночными заменами остатков цистеина на остатки аланина в положениях C303, C322, C328 и C350, а также с двойными заменами C303A+C322A, C303A+C328A и C322A+C328A (см. табл. 3).

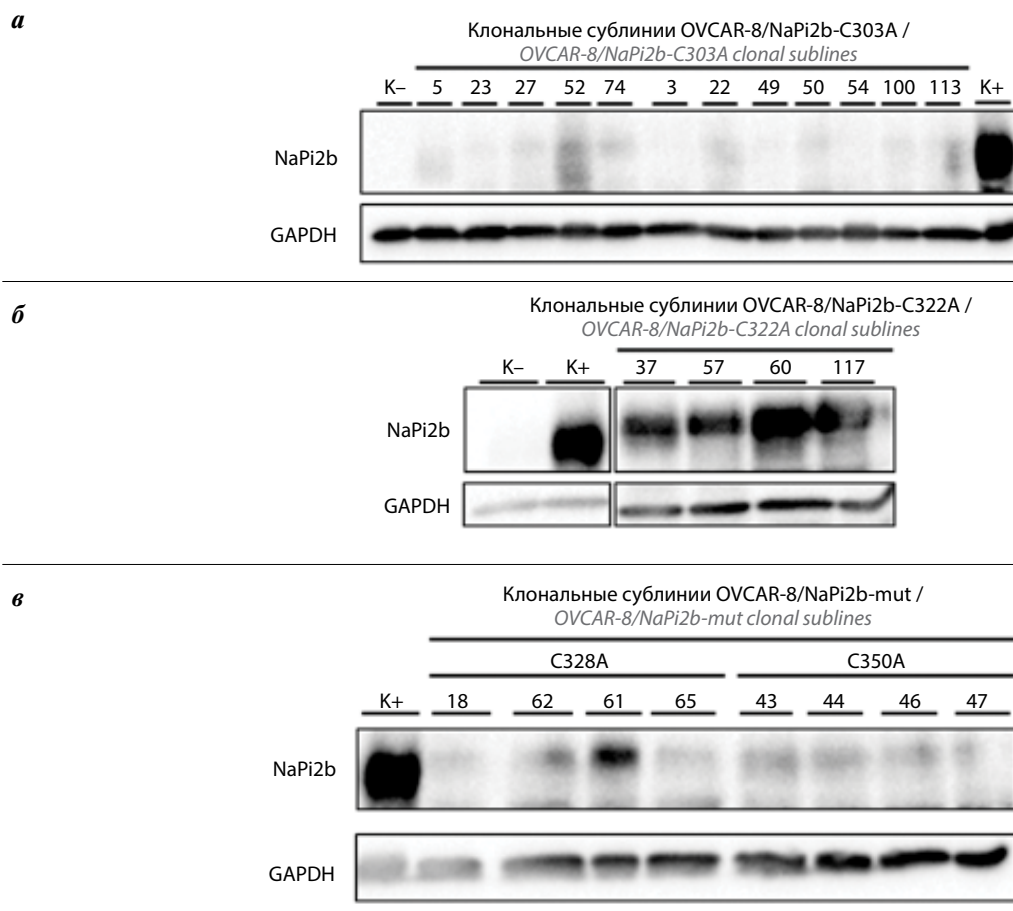


Рис. 5. Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с одиночными заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-C303A (а), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A и OVCAR-8/NaPi2b-C350A (в). K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

Fig. 5. Results of the analysis of recombinant mutant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with single substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-C303A (a), OVCAR-8/NaPi2b-C322A (б), OVCAR-8/NaPi2b-C328A и OVCAR-8/NaPi2b-C350A (в). K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

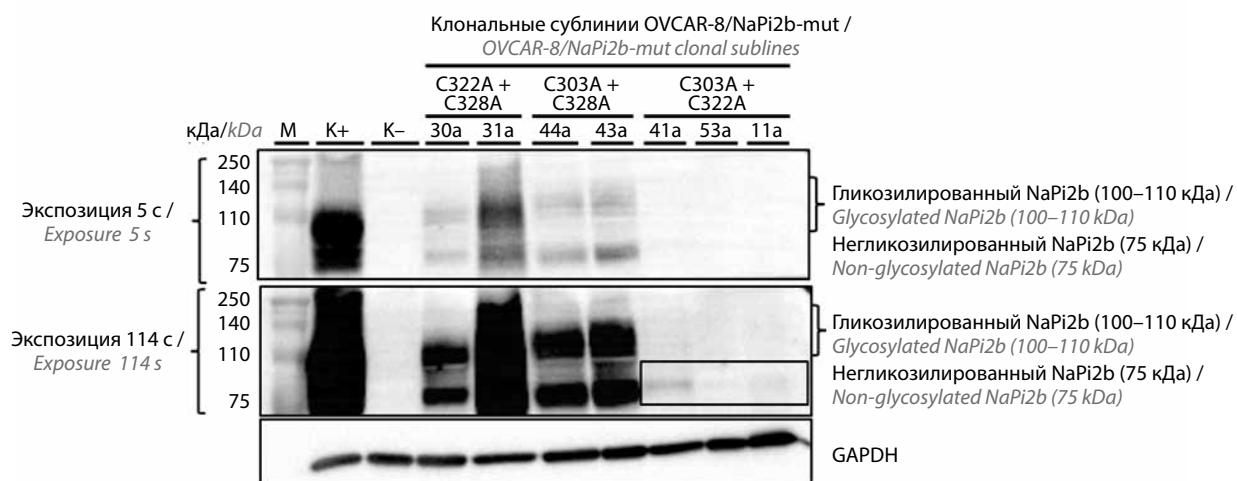


Рис. 6. Результаты анализа содержания рекомбинантных мутантных вариантов натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с двойными заменами остатков цистеина C303, C322, C328 и C350 на остатки аланина в клональных сублиниях OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A, OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A, OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A. K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

Fig. 6. Results of the analysis of recombinant mutant sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b with double substitutions of cysteine residues C303, C322, C328 and C350 with alanine residues content in clonal sublines OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A, OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A, OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A. K- – OVCAR-8/empty; K+ – OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11

ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск новых опухоль-специфических мишеней для разработки противоопухолевых препаратов является одной из самых актуальных задач современной онкологии. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является примером потенциальной опухоль-специфической мишени, поскольку содержит в составе своего ВКД скрытый эпитоп MX35, который при введении *in vivo* распознается моноклональными антителами преимущественно в клетках опухоли [24, 25]. Известно, что доступность эпитопа MX35 для антител зависит от дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b, которые потенциально могут образовываться между остатками цистеина C303, C322, C328 и C350 [15, 26]. Однако сколько и между какими именно остатками цистеина образуются дисульфидные связи, при которых конформация ВКД транспортера NaPi2b позволяет антителам связаться с эпитопом MX35 в опухолевых клетках, неизвестно. В связи с особенностями работы с трансмембранными белками, к которым относится транспортер NaPi2b, необходимо разрабатывать подходы, позволяющие изучать их структуру, в том числе образование дисульфидных связей, в живых клетках с сохранением их нативной конформации.

В результате проведенной работы с помощью лентивирусной трансдукции получены клональные сублинии

карциномы яичника OVCAR-8, содержащие различные рекомбинантные варианты натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b с одиночными (C303A, C322A, C328A, C350A) и двойными (C303A+C322A, C303A+C328A, C322A+C328A) заменами остатков цистеина на остатки аланина в области его ВКД (см. табл. 3).

Отмечено, что введенные замены аминокислотных остатков цистеина в области ВКД влияли на содержание и электрофоретическую подвижность рекомбинантных мутантных форм транспортера NaPi2b (см. рис. 5 и 6). В частности, как при одиночных, так и при двойных заменах остатков цистеина мы наблюдали снижение содержания мутантных рекомбинантных форм транспортера NaPi2b по сравнению с NaPi2b дикого типа, особенно в случае аминокислотных замен C303A (рис. 5, а) и C303A+C322A (см. рис. 6). Мы предполагаем, что это может быть связано как с низким уровнем транскрипции трансгенов, кодирующих данные мутантные варианты транспортера NaPi2b, так и с посттрансляционной нестабильностью их структуры из-за нарушения образования дисульфидных связей в области ВКД [36–39], что могло способствовать их внутриклеточной деградации.

Известно, что образование дисульфидных связей в трансмембранных белках тесно взаимосвязано с N-гликозилированием, как было показано для ряда

Таблица 3. Состав панели клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8 для изучения особенностей формирования дисульфидных связей в области внеклеточного домена натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b

Table 3. Panel of the OVCAR-8 ovarian carcinoma clonal sublines for investigation of disulfide bonds formation in the largest extracellular domain of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b

Клональная сублиния Clonal subline	Вариант рекомбинантного транспортера NaPi2b, содержащийся в сублинии The recombinant NaPi2b transporter variant contained in the subline
OVCAR-8/NaPi2b-wt/1B11	Дикого типа Wild-type
OVCAR-8/NaPi2b-C303A/74	С аминокислотной заменой C303A With C303A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C322A/60	С аминокислотной заменой C322A With C322A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C328A/61	С аминокислотной заменой C328A With C328A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C350A/43	С аминокислотной заменой C350A With C350A amino acid substitution
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C322A/41a	С аминокислотными заменами C303A и C322A With C303A and C322A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C303A+C328A/44a	С аминокислотными заменами C303A и C328A With C303A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/NaPi2b-C322A+C328A/31a	С аминокислотными заменами C322A и C328A With C322A and C328A amino acid substitutions
OVCAR-8/empty/2H7	Не содержащий NaPi2b Without NaPi2b

белков [39]. Особенности посттрансляционных модификаций белков, в свою очередь, тоже могут влиять на их стабильность [36–39]. В молекуле транспортера NaPi2b есть несколько потенциальных сайтов для N-гликозилирования, которые находятся на том же участке его ВКД, что изучаемые в данной работе остатки цистеина [15]. В нашей работе результаты вестерн-блоттинга показали, что у мутантных вариантов транспортера NaPi2b электрофоретическая подвижность ниже, чем у транспортера дикого типа (см. рис. 5 и 6). Однако при замене С303А+С322А удалось детектировать только негликозилированную форму транспортера NaPi2b (см. рис. 6; образцы 41а, 53а, 11а). Можно предположить, что отсутствие дисульфидных связей в области ВКД в мутантных вариантах транспортера NaPi2b приводит к изменению профиля N-гликозилирования, от которого зависят конформация и стабильность белка. Однако это требует экспериментального подтверждения с помощью специализированных методик для изучения дисульфидных связей и N-гликозилирования, что может быть осуществлено с использованием полученной панели клеточных сублиний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования мы впервые получили панель клональных сублиний карциномы яичника человека

OVCAR-8, содержащих рекомбинантный транспортер NaPi2b дикого типа, а также его мутантные варианты с одиночными (С303А, С322А, С328А, С350А) и двойными (С303А+С322А, С303А+С328А, С322А+С328А) заменами остатков цистеина на остатки аланина в области его ВКД, где расположен скрытый эпитоп МХ35. Введенные аминокислотные замены влияли как на уровень содержания рекомбинантных вариантов транспортера NaPi2b, так и на его электрофоретическую подвижность. Мы предполагаем, что исследуемые замены остатков цистеина приводят к изменениям посттрансляционных модификаций транспортера NaPi2b, включая образование дисульфидных связей и N-гликозилирование в области ВКД, что может влиять на его конформацию и стабильность. Полученные нами данные будут полезны для исследования конформации ВКД, его структуры и роли в регуляции активности транспортера NaPi2b, а также механизма образования скрытого эпитопа МХ35 с использованием полученной нами панели клональных сублиний карциномы яичника OVCAR-8. Понимание особенностей образования скрытого эпитопа МХ35 в молекуле транспортера NaPi2b может помочь в будущем предсказывать и находить новые скрытые опухоль-специфические эпитопы в составе других трансмембранных белков, представленных на поверхности опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Forster I.C. The molecular mechanism of SLC34 proteins: insights from two decades of transport assays and structure-function studies. *Pflugers Arch European J Physiology* 2019;471:15–42. DOI: 10.1007/s00424-018-2207-z
- Murer H., Forster I., Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch* 2004;447:763–7. DOI: 10.1007/s00424-003-1072-5
- Homann V., Rosin-Steiner S., Stratmann T. et al. Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. *Arch Oral Biol* 2005;50(9):759–68. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2005.01.009
- Nishimura M., Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008;23(1):22–44. DOI: 10.2133/dmpk.23.22
- Kiyamova R., Shyian M., Lyzogubov V.V. et al. Immunohistochemical analysis of NaPi2b protein (MX35 antigen) expression and subcellular localization in human normal and cancer tissues. *Exp Oncol* 2011;33(3):157–61.
- Rangel L.B.A., Sherman-Baust C.A., Wernyj R.P. et al. Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene* 2003;22(46):7225–32. DOI: 10.1038/sj.onc.1207008
- Kopantzev E.P., Monastyrskaya G.S., Vinogradova T.V. et al. Differences in gene expression levels between early and later stages of human lung development are opposite to those between normal lung tissue and non-small lung cell carcinoma. *Lung Cancer* 2008;62(1):23–34. DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.02.011
- Gryshkova V., Goncharuk I., Gurtovyy V. et al. The study of phosphate transporter NAPI2B expression in different histological types of epithelial ovarian cancer. *Exp Oncol* 2009;31(1):37–42.
- Chen D.R., Chien S.Y., Kuo S.J. et al. SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. *Anticancer Res* 2010;30(10):4135–40.
- Kim H.S., Kim D.H., Kim J.Y. et al. Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *Korean J Intern Medicine* 2010;25(4):399–407. DOI: 10.3904/kjim.2010.25.4.399
- Shyian M., Gryshkova V., Kostianets O. et al. Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. *Exp Oncol* 2011;33(2):94–8.
- Soares I.C., Simões K., de Souza J.E. et al. In Silico analysis and immunohistochemical characterization of NaPi2b protein expression in ovarian carcinoma with monoclonal antibody Mx35. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20(2):165–72. DOI: 10.1097/pai.0b013e318228e232
- Zhang Z., Ye S., Zhang M. et al. High expression of SLC34A2 is a favorable prognostic marker in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biol* 2017;39(7):1010428317720212. DOI: 10.1177/1010428317720212
- Mattes M.J., Look K., Furukawa K. et al. Mouse monoclonal antibodies to human epithelial differentiation antigens expressed on the surface of ovarian carcinoma ascites cells. *Cancer Res* 1987;47(24 Pt 1):6741–50.
- Yin B.W.T., Kiyamova R., Chua R. et al. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas. *Cancer Immunol* 2008;8:3.
- Kiyamova R.G., Gryshkova V.S., Usenko V.S. et al. Identification of phosphate transporter Napi2b as MX35 cancer antigen by modified SEREX approach. *Biopolym Cell* 2008;24(3):218–24. DOI: 10.7124/bc.0007A3
- Kiyamova R., Gryshkova V., Ovcharenko G. et al. Development of monoclonal antibodies specific for the human sodium-dependent

- phosphate co-transporter NaPi2b. *Hybridoma* 2008;27(4):277–84. DOI: 10.1089/hyb.2008.0015
18. Dos Santos M.L., Yeda F.P., Tsuruta L.R. et al. Rebmab200, a humanized monoclonal antibody targeting the sodium phosphate transporter NaPi2b displays strong immune mediated cytotoxicity against cancer: a novel reagent for targeted antibody therapy of cancer. *PLoS One* 2013;8(7):e70332. DOI: 10.1371/journal.pone.0070332
 19. Fessler S., Dirksen A., Collins S.D. et al. XMT-1592, a site-specific dolasynthen-based NaPi2b-targeted antibody-drug conjugate for the treatment of ovarian cancer and lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2020;80(16_Suppl.):2894. DOI: 10.1158/1538-7445.am2020-2894
 20. Bodyak N.D., Mosher R., Yurkovetskiy A.V. et al. the dolaflexin-based antibody-drug conjugate XMT-1536 targets the solid tumor lineage antigen SLC34A2/NaPi2b. *Mol Cancer Ther* 2021;20(5):896–905. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-20-0183
 21. Kostianets O., Shyian M., Sergiy D. et al. Serological analysis of SEREX-defined medullary breast carcinoma-associated antigens. *Cancer Invest* 2012;30(7):519–27. DOI: 10.3109/07357907.2012.697231
 22. Garifulin O.M., Kykot V.O., Gridina N.Y. et al. Application of SEREX-analysis for identification of human colon cancer antigens. *Exp Oncol* 2015;37(3):173–80. DOI: 10.31768/2312-8852.2015.37(3):173-180
 23. Kostianets O., Shyyan M., Antoniyuk S.V. et al. Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection. *Biomarkers* 2017;22(2):149–56. DOI: 10.1080/1354750X.2016.1252952
 24. Rubin S.C., Kostakoglu L., Divgi C. et al. Biodistribution and intraoperative evaluation of radiolabeled monoclonal antibody Mx35 in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51(1):61–6. DOI: 10.1006/gyno.1993.1247
 25. Lindegren S., Andrade L.N.S., Bäck T. et al. Binding affinity, specificity and comparative biodistribution of the parental murine monoclonal antibody MX35 (Anti-NaPi2b) and its humanized version Rebmab200. *PLoS One* 2015;10(5):e0126298. DOI: 10.1371/journal.pone.0126298
 26. Коротаева А.В., Булатова Л.Ф., Власенкова Р.А., Киямова Р.Г. Распознавание Na-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках бактерий и эукариот. *Биотехнология* 2022;38(5):66–72. DOI: 10.56304/S023427582205009X
Korotaeva A.V., Bulatova L.F., Vlasenkova R.A., Kiyamova R.G. Recognition of the Na-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in bacterial and eukaryotic cells. *Biotechnologia = Biotechnology* 2022;38(5):66–72. (In Russ.). DOI: 10.56304/S023427582205009X
 27. Kiyamova R., Minigulova L.F., Skripova V. et al. N-glycosylation status of membrane phosphate transporter NaPi2b is crucial for its epitope recognition by monoclonal antibody in tumour cells. *Annals of Oncology* 2020;31(Suppl. 5):S1227–8. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2193
 28. Булатова Л.Ф., Скрипова В.С., Коротаева А.В. и др. Распознавание мутантных форм натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в клетках рака яичника. *Казанский медицинский журнал* 2022;103(4):608–16. DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ2022-608>
 - Bulatova L.F., Skripova V.S., Korotaeva A.V. et al. Recognition of mutant forms of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies in ovarian cancer cells. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2022;103(4):608–16. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ2022-608>
 29. Reshetnikova D., Bulatova L.F., Skripova V. et al. Effect of disulfide bonds and N-glycosylation on the recognition of the NaPi2b transporter by monoclonal antibodies. *Annals of Oncology* 2022;33(Suppl. 8):S1408. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.09.082
 30. Минигулова Л.Ф., Скрипова В.С., Нургуалиева А.К. и др. Распознавание натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами N-NaPi2b в клетках карциномы яичника. *Ученые записки Казанского университета* 2020;162(4):529–40. DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540
Minigulova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K. Recognition of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b by monoclonal antibodies N-NaPi2b in ovarian cancer cells. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta = Scientific Notes of Kazan University* 2020;162(4):529–40 (In Russ.). DOI: 10.26907/2542-064X.2020.4.529-540
 31. Firsova D., Levashov I., Reshetnikova D. et al. Analysis of the sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b expression in human tumor cell lines. *EJCI* 2022;52(S1):114–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/eci.13796>
 32. Bulatova L.F., Skripova V.S., Nurgalieva A.K. et al. Structurally constrained tumor-specific epitope within the largest extracellular domain of sodium-dependent phosphate transporter NaPi2b. *Ann Oncol* 2021;32(5):S368–9. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.304
 33. Makhov P., Golovine K., Teper E. et al. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death. *Br J Cancer* 2014;110(4):899–907. DOI: 10.1038/bjc.2013.810
 34. Longo P.A., Kavran J.M., Kim M.S., Leahy D.J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* 2013;529:227–40. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5
 35. Boichuk S., Dunaev P., Skripova V. et al. Unraveling the mechanisms of sensitivity to anti-FGF therapies in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST) lacking secondary KIT mutations. *Cancers (Basel)* 2023;15(22):5354. DOI: 10.3390/cancers15225354
 36. Zavodszky M., Chen C.W., Huang J.K. et al. Disulfide bond effects on protein stability: designed variants of Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V. *Protein Sci* 2001;10(1):149–60. DOI: 10.1110/ps.26801
 37. Karimi M., Ignasiak M.T., Chan B. et al. Reactivity of disulfide bonds is markedly affected by structure and environment: implications for protein modification and stability. *Sci Rep* 2016;6:38572. DOI: 10.1038/srep38572
 38. Feige M.J., Braakman I., Hendershot L.M. Basic principles, cellular regulation and engineering. In: *Oxidative folding of proteins*. Ed. by M.J. Feige. The Royal Society of Chemistry, 2018. Pp. 1–33.
 39. Bakshi T., Pham D., Kaur R., Sun B. Hidden relationships between N-glycosylation and disulfide bonds in individual proteins. *Int J Mol Sci* 2022;23(7):3742. DOI: 10.3390/ijms23073742

Благодарность. Исследование выполнено при инфраструктурной поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («Приоритет-2030»).

Acknowledgement. The study was carried out with infrastructure support of the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (Priority-2030).

Вклад авторов

В.С. Скрипова: разработка дизайна исследования, проведение лабораторных исследований, анализ данных, написание текста статьи;
Д.А. Фирсова, А.В. Килунов, Л.Ф. Булатова, М.А. Попутский: проведение лабораторных исследований, анализ данных;
Р.Г. Киямова: разработка дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

V.S. Skripova: research design development, laboratory research, data analysis, article writing;
D.A. Firsova, A.V. Kilunov, L.F. Bulatova, M.A. Poputsky: laboratory research, data analysis;
R.G. Kiyamova: research design development, data analysis, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.С. Скрипова / V.S. Skripova: <https://orcid.org/0000-0002-6342-0390>
Д.А. Фирсова / D.A. Firsova: <https://orcid.org/0009-0007-5744-1615>
А.В. Килунов / A.V. Kilunov: <https://orcid.org/0009-0007-2262-4200>
Л.Ф. Булатова / L.F. Bulatova: <https://orcid.org/0000-0001-6696-8477>
М.А. Попутский / M.A. Poputsky: <https://orcid.org/0009-0008-0426-3621>
Р.Г. Киямова / R.G. Kiyamova: <https://orcid.org/0000-0002-2547-2843>

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 (грант № 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant (grant No. 23-15-00456, <https://rscf.ru/project/23-15-00456/>).

Статья поступила: 26.06.2024. **Принята к публикации:** 03.09.2024. **Опубликована онлайн:** 11.12.2024.

Article submitted: 26.06.2024. **Accepted for publication:** 03.09.2024. **Published online:** 11.12.2024.