

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Предикторы метастатического
поражения регионарных
лимфатических узлов при раке
молочной железы*

*Взаимосвязь компонентов EGFR/
PI3K/AKT-сигнального пути с
эффективностью терапии
тамоксифеном*

*Молекулярно-генетическая
гетерогенность
меланомы глаза*



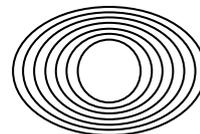
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

С 2014 г. журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора 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>

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Целевая читательская аудитория: онкологи, молекулярные биологи, генетики, биохимики, вирусологи, онкоэпидемиологи, химиотерапевты.

Контент: обзоры, миниобзоры, краткие сообщения и полноразмерные экспериментальные статьи, комментарии ведущих специалистов.

Члены редакционной коллегии и авторы журнала – ведущие российские и зарубежные онкологи, молекулярные биологи, генетики, химиотерапевты и специалисты смежных специальностей.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

3 ТОМ 5
'18

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

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

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

Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор Т.Н. Помилуйко
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
И.В. Гапонова, +7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору

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

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.
2018. Том 5. № 3. 1–92

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 1000 экз.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

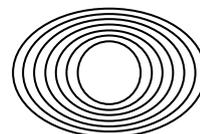
Since 2014, the journal was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

The journal's electronic version is available in 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

Target audience: oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, cancer epidemiologists, chemotherapists.

Information content: reviews, mini-reviews, brief communications and full-size research articles, comments of leading experts.

Editorial board members and authors of the journal are the leading Russian and foreign oncologists, molecular biologists, geneticists, chemotherapists and specialists of related professions.

FOUNDED IN 2014

3^{Vol. 5}
'18

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

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

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader T.N. Pomiluyko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager I.V. Gaponova,
+7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@abvpress.ru

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

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

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

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

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

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2018. Vol. 5
No. 3. 1–92

© PH "ABV-Press", 2018

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

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

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zborovskaya Irina B., *PhD, Leading Researcher of the Laboratory of 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)*

Yakubovskaya Marianna G., *PhD, DSc, 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., *PhD, DSc, 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., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

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

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

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

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

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

Информация для авторов

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

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

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

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

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

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

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

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

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- 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, CMYK 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 подрисовочными 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 подрисовочной 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, полимерная цепная реакция (ПЦР)).

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, PMID и 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> или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- Ю.А. Дергунова, В.В. Родионов, В.К. Боженко, В.В. Кометова, М.В. Дардык*
Клинико-морфологические и молекулярно-генетические предикторы метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы 8
- Е.В. Карабина, Л.Н. Любченко, М.М. Давыдов*
Механизмы приобретенной резистентности к анти-EGFR-препаратам при немелкоклеточном раке легкого, не связанной с мутацией T790M и их значение в клинической практике 17
- Л.Г. Соленова, Е.А. Некрасова*
Медицинские работники: профессиональные канцерогенные факторы и онкологический риск 25

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, М.В. Завьялова, С.В. Паталяк,
Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска*
Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы 40
- Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, В.В. Назарова, И.А. Утяшев, К.В. Орлова,
Д.А. Понкратова, Д.В. Мартынков, Л.В. Демидов*
Молекулярно-генетическая гетерогенность меланомы глаза 51
- А.А. Лушникова, А.В. Костарев, Д.А. Понкратова, А.В. Онян, Е.Г. Глубокова, С.М. Андреев*
Цитотоксичные катионные пептиды как лиганды рецепторного нуклеолина 59
- К.В. Смирнова, Н.Б. Сенюта, И.В. Ботезату, Т.Е. Душенькина, А.К. Лубенская,
А.А. Фроловская, С.В. Петров, А.В. Лихтенштейн, В.Э. Гурцевич*
Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена *LMP1* 65
- Т.А. Зыкова, Т.И. Моисеенко, Е.М. Франциянц, М.А. Вовкочина*
Взаимосвязь ВПЧ-инфицирования карциномы эндометрия с ее клинико-морфологическими особенностями 75
- С.А. Кузьмичев, А.В. Комельков, Е.М. Чевкина*
Способность к формированию дуплексов как фактор внутриклеточного распределения микроРНК 83

REVIEWS

- Yu.A. Dergunova, V.V. Podionov, V.K. Bozhenko, V.V. Kometova, M.V. Dardyk*
**Clinical, morphological, and molecular genetic predictors of metastatic lesions
in the regional lymph nodes in breast cancer** 8
- E.V. Karabina, L.N. Lubchenko, M.M. Davydov*
**The mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR drugs in non-small cell lung cancer not associated
with T790m mutation and their significance in clinical practice** 17
- L.G. Solenova, L.A. Nekrasova*
Healthcare workers: occupational carcinogenic factors and cancer risk 25

EXPERIMENTAL REPORTS

- T.A. Dronova, N.N. Babyshkina, M.V. Zavyalova, S.V. Patalyak,
E.M. Slonimskaya, N.V. Cherdyntseva, J.G. Kzhyshkowska*
**Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients
with estrogen-dependent breast cancer** 40
- N.N. Mazurenko, I.V. Tsyganova, V.V. Nazarova, I.A. Utyashev,
K.V. Orlova, D.A. Ponkratova, D.V. Martinkov, L.V. Demidov*
Molecular and genetic diversity in melanoma of eye 51
- A.A. Lushnikova, A.V. Kostarev, D.A. Ponkratova, A.V. Onyan, E.G. Glubokova, S.M. Andreev*
Cytotoxic cationic peptides as a ligands for receptor nucleolin 59
- K.V. Smirnova, N.B. Senyuta, I.V. Botezatu, T.E. Dushenkina,
A.K. Lubenskaya, A.A. Frolovskaya, S.V. Petrov, A.V. Lichtenstein, V.E. Gurtsevitch*
Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of *LMP1* oncogene 65
- T.A. Zykova, T.I. Moiseenko, E.M. Frantsiyants, M.A. Vovkochina*
Interrelation of HPV-infection of endometry carcinoma and its clinical-morphological features 75
- S.A. Kuzmichev, A.V. Komelkov, E.M. Tchekina*
Ability to form duplexes as a factor of intracellular microRNA distribution 83

Клинико-морфологические и молекулярно-генетические предикторы метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы

Ю.А. Дергунова¹, В.В. Родионов^{1,2}, В.К. Боженко^{2,3}, В.В. Кометова², М.В. Дардык²

¹Институт медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; Россия, 432000 Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Академика Опарина, 4;

³ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; Россия, 17997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Юлия Анатольевна Дергунова dergunova.yu@mail.ru

Несмотря на достаточное количество накопленных данных, все еще не выделены факторы, на основании которых можно было бы с высокой степенью достоверности судить о статусе регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы. В обзоре представлены данные литературы, касающиеся влияния клинико-морфологических, молекулярно-биологических и генетических характеристик первичной опухоли на метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов. В работу включены данные 66 зарубежных и отечественных статей.

Ключевые слова: рак молочной железы, лимфатический узел, лимфогенное метастазирование, молекулярно-генетический предиктор

Для цитирования: Дергунова Ю.А., Родионов В.В., Боженко В.К. и др. Клинико-морфологические и молекулярно-генетические предикторы метастатического поражения регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):8–16.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-8-16

Clinical, morphological, and molecular genetic predictors of metastatic lesions in the regional lymph nodes in breast cancer

Yu.A. Dergunova¹, V.V. Podionov^{1,2}, V.K. Bozhenko^{2,3}, V.V. Kometova², M.V. Dardyk²

¹Institute of Medicine, Ecology, and Physical Culture, Ulyanovsk State University; 42 L'va Tolstogo St., Ulyanovsk 432000, Russia;

²V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia; 4 Akademika Oparina St., Moscow 117997, Russia;

³Russian Scientific Center of Roentgen Radiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia

Despite the sufficient amount of data accumulated in the literature, there are still no factors, on the basis of which it would be possible to estimate the regional lymph nodes status in breast cancer with a high degree of accuracy. The review presents literature data relating to the influence of clinicopathological, molecular-biological and genetic characteristics of primary tumor on lymph node metastases. Data of 66 foreign and Russian articles are included.

Key words: breast cancer, lymph node, lymph nodes metastasis, molecular-genetic predictor

For citation: Dergunova Yu.A., Podionov V.V., Bozhenko V.K. et al. Clinical, morphological, and molecular genetic predictors of metastatic lesions in the regional lymph nodes in breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):8–16.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее актуальной проблемой современной онкологии, что в первую очередь обусловлено высокой заболеваемостью. Заболеваемость РМЖ (стандартизованный показатель) в России в 2015 г. достигла 49,75 случая на 100 тыс. женского населения, причем ее прирост за последние 10 лет составил 21,39 % [1]. Несмотря на рост заболеваемости, за последние годы чаще стали выявлять ранние формы рака. В 2016 г. РМЖ на I–II

стадиях был диагностирован у 69,7 % пациенток, тогда как 10 лет назад этот показатель составлял 61,8 %.

Хирургический метод, который является основным в лечении РМЖ, на протяжении своей истории претерпел множество модификаций. В настоящее время хирурги-онкологи отдают предпочтение методикам с максимально возможным сохранением объема органа (секторальная резекция, лампэктомия). Сокращение объемов оперативного вмешательства касается не только удаляемой ткани молочной железы, но и уменьшения

объемов аксиллярной лимфодиссекции. Последнее, вероятно, имеет даже более принципиальное значение в отношении клинически значимых осложнений. Отек верхней конечности, парестезии, хронический болевой синдром, ограничение движений встречаются, по данным различных источников, у 5–50 % пациенток, которым выполняли аксиллярную лимфаденэктомию [2–4].

Одновременно можно констатировать, что у 1/3–1/2 пациенток, страдающих РМЖ, удаление регионарных лимфатических узлов (ЛУ) выполняется необоснованно, так как после гистологического исследования операционного материала у них не обнаруживаются метастазы в аксиллярных ЛУ. Не случайно биопсия сигнального ЛУ стала достойной альтернативой традиционной хирургии на лимфатическом аппарате при раннем РМЖ и активно внедряется в практику. Данная методика позволила значительно снизить количество послеоперационных осложнений, вызванных лимфодиссекцией, но не исключила их полностью. Частота осложнений после применения биопсии сигнального ЛУ, по данным разных авторов, колеблется от 4 до 15 % [4, 5]. К тому же она имеет существенное ограничение в применении ввиду необходимости использования специального материально-технического оснащения. Поэтому в последние годы онкологи активно дискутируют по вопросам полного отказа от хирургического вмешательства на регионарных ЛУ у больных РМЖ при отсутствии клинических данных, свидетельствующих об их поражении.

Таким образом, становится очевидной необходимость поиска новых предикторов метастатического поражения регионарных ЛУ в первую очередь на основании биологической характеристики первичной опухоли.

Клинико-морфологические предикторы метастатического поражения лимфатических узлов

Еще в 1969 г. В. Fisher и соавт. в своем исследовании выявили зависимость метастатического поражения подмышечных ЛУ от размера первичной опухоли (средний размер опухоли у пациенток с непораженными подмышечными ЛУ составил 2,7 см, с поражением 1–3 ЛУ – 2,9 см, с поражением 4 ЛУ и более – 3,7 см) [6]. Подавляющее большинство последующих исследований также продемонстрировало рост частоты метастазов в регионарных ЛУ с увеличением размера первичной опухоли. Ряд авторов указывают на увеличение вероятности метастатического поражения регионарных ЛУ при размере первичной опухоли более 2 см [7, 8], другие исследователи выявили подобную закономерность уже при увеличении размера опухолевого узла более 1 см [9, 10]. Данная линейная зависимость может объясняться предположением о том, что размер является параметром, непосредственно отражающим время существования опухоли, в течение которого ею приобретает метастатический потен-

циал. Однако только размер и длительность существования опухоли не могут объяснить весь спектр особенностей течения опухолевого процесса. Кроме того, нельзя исключить тот факт, что размер опухолевого узла является вариабельной величиной ввиду различных подходов к его измерению.

Частота выявления случаев РМЖ с мультифокальным или мультицентричным типом роста варьирует в широком диапазоне – от 13 до 65 % [11]. В настоящее время мультифокальными/мультицентричными новообразованиями молочной железы принято считать опухоли с наличием 2 или более узлов, разделенных нормальной тканью, в одной молочной железе (в 1 квадранте для мультифокальных опухолей и в разных квадрантах для мультицентричных). Обычно за размер опухолевого узла принимается линейно измеренный максимальный диаметр. Однако теоретические модели показывают, что склонность к метастазированию зависит от общего количества злокачественных клеток [12], а этот параметр, в свою очередь, лучше оценивается по трехмерным параметрам, например по объему опухоли. Это может служить одним из объяснений неоднократно продемонстрированного феномена повышенной склонности к регионарному метастазированию мультифокальных/мультицентричных форм РМЖ по сравнению с унифокальными [13, 14]. Кроме этого, существует мнение о том, что более активной лимфогенной диссеминации мультицентричного РМЖ способствует биологическое разнообразие компонентов опухолевой ткани.

Не существует единого мнения о гистологическом варианте рака и степени злокачественности (согласно критериям Ноттингемской классификации, системе градации Scarff-Bloom-Richardson в модификации Elston-Ellis) как о достоверных предикторах лимфогенного метастазирования. Однако в литературе представлено значительное количество исследований, свидетельствующих о том, что III степень злокачественности (G3) опухоли – независимый фактор риска метастатического поражения ЛУ [15].

Инфильтрирующий РМЖ неспецифического типа (ранее – протоковый) составляет более 80 % других вариантов инвазивного РМЖ и является самой обширной гетерогенной группой, в которую входят опухоли, характеризующиеся отсутствием специфических гистологических черт. При размере первичного очага инвазивного протокового рака до 5 мм частота регионарного метастазирования составляет 18 %, от 5 до 10 мм этот показатель увеличивается до 46 %. В работе Н.Н. Волченко показано, что дальнейшее увеличение размера первичной опухоли на частоте регионарного метастазирования не отражается [16].

Z. Chen и соавт. в 2017 г. проанализировали данные 796 335 пациенток с протоковым (89,3 %) и дольковым (10,7 %) вариантами инвазивного рака и пришли к выводу о том, что эти 2 наиболее часто диагностируемые морфологические формы имеют разные клинические

характеристики. Частота поражения регионарного лимфатического аппарата также имеет достоверные различия в этих группах. Частота поражения 1–3 ЛУ составила 21,1 % при дольковом раке и 22,8 % при протоковом. При этом поражение 4–10 ЛУ было зафиксировано в 9,6 % случаев при дольковом варианте и в 6,8 % при протоковом, а метастатическое поражение более 10 узлов – в 6,0 % случаев при дольковом раке и только в 2,8 % при протоковом [17].

Прогностически благоприятные гистологические варианты РМЖ, такие как тубулярный, муцинозный, папиллярный, медулярный, имеют более низкую частоту поражения подмышечных ЛУ, чем протоковый или дольковый варианты рака.

Тубулярный РМЖ – один из наиболее часто диагностируемых вариантов в группе опухолей с хорошим прогнозом. По мнению многих авторов, эта морфологическая форма при размере опухоли менее 1 см имеет крайне низкий метастатический потенциал [18, 19]. В 2001 г. G. Papadatos и соавт. при использовании метанализа выявили, что только 6,6 % пациенток с верифицированной тубулярной карциномой имеют метастатическое поражение аксиллярных ЛУ, а в своем собственном исследовании диагностировали метастазы в подмышечных ЛУ при тубулярной карциноме только в 4,5 % случаев. При этом ни в одном из наблюдений при размере опухоли менее 1 см не выявлено метастатического поражения подмышечных ЛУ [18]. Другие исследователи утверждают, что тубулярный рак имеет достаточно высокую склонность (до 15 %) к лимфогенному метастазированию [20]. Число больных с метастазами в ЛУ в группе тубулярной карциномы в работе S.L. Wong и соавт. составило 17 %, причем авторы не обнаружили связи с увеличением размера первичной опухоли и отмечают наличие метастазов в ЛУ при размере опухолевого узла 0,3 см [21]. Столь агрессивное поведение данного морфологического варианта опухоли до конца не нашло своего объяснения, однако в исследовании A.R.M. Wilson высказывается предположение о «фенотипическом дрейфе» тубулярного рака, в ходе которого происходит преобразование в смешанные формы (например, тубулярно-протоковый), что ведет к изменению прогноза заболевания [22].

Считается, что коллоидная (муцинозная, слизистая) карцинома – медленно растущая, менее агрессивная гистологическая форма РМЖ, чем протоковый рак. Однако, по данным P.P. Rosen и соавт., почти 50 % летальных исходов пациенток происходит спустя 12 лет после постановки диагноза [23]. Другие исследования с длительным периодом наблюдения свидетельствуют о том, что прогрессирование и летальный исход развиваются у 30–32 % пациенток с истинными коллоидными карциномами, причем чаще в группе пациенток с первично диагностированным метастатическим поражением регионарных ЛУ [24]. При муцинозном РМЖ метастазы в подмышечных ЛУ развиваются довольно редко – в 4–7 % наблюдений [21, 25].

В большинстве работ сообщается о более низкой склонности к лимфогенному метастазированию медулярного РМЖ по сравнению с инфильтрирующим протоковым раком [26], однако в отдельных исследованиях эти показатели возрастают до 21 % [21].

Принадлежность опухоли к редкому морфологическому варианту, несомненно, имеет прогностическую ценность в определении вероятности метастатического поражения регионарных ЛУ при РМЖ, но она весьма ограничена, поскольку исследования, как правило, включают малое количество таких случаев. Кроме того, нельзя исключать погрешности диагностики данных морфологических форм рака, связанных с весьма размытыми критериями дифференцирования истинных и смешанных вариантов.

Было высказано предположение о том, что солидные опухоли не имеют внутриопухолевых лимфатических сосудов из-за увеличенного интерстициального давления, создаваемого пролиферирующим пулом опухолевых клеток [27]. С использованием специфических маркеров наличие лимфатических сосудов в опухоли было доказано многими исследователями, кроме того, продемонстрировано их активное функциональное состояние, так как в их просвете зачастую обнаруживаются опухолевые эмболы [28]. Однако считается, что более значимую роль в лимфогенной диссеминации опухоли играют перитуморальные лимфатические сосуды.

Выявление лимфоваскулярной инвазии в опухоли морфологическим методом сопряжено с рядом сложностей, в первую очередь это касается исключения артефактов ретракции и отсутствия возможности четкой визуализации стенки лимфатического сосуда при световой микроскопии. Результаты исследований показывают, что обнаружение лимфоваскулярной инвазии варьирует от 10 до 49 % на окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезах, тогда как этот диапазон изменяется (от 21 до 42 %) при использовании дополнительного иммуногистохимического окрашивания [29]. Это указывает на то, что иммуногистохимический метод (с антителами D2–40, LYVE-1 и др.) является более надежным для определения наличия инвазии опухоли в лимфатические сосуды.

По результатам целого ряда исследований установлено, что лимфоваскулярная инвазия – самостоятельный предиктор лимфогенного метастазирования РМЖ [13, 30, 31]. В метаанализе, проведенном S. Zhang и соавт. в 2017 г., включившем 28 исследований (общее число пациенток с РМЖ составило 2920), продемонстрировано, что плотность перитуморальных лимфатических сосудов и лимфоваскулярная инвазия статистически значимо коррелируют с наличием метастазов в регионарных ЛУ [32]. Общая частота обнаружения лимфоваскулярной инвазии составила 23,85 % в группе пациенток без метастатического поражения ЛУ по сравнению с 45,85 % в группе больных с наличием

метастазов в регионарных ЛУ ($r = 0,24$; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,19–0,28).

По результатам собственного анализа клинико-морфологических данных 529 пациенток с РМЖ статистически значимыми предикторами метастатического поражения регионарных ЛУ явились размер опухоли ($p = 0,0005$), степень злокачественности ($p = 0,004$), лимфоваскулярная инвазия ($p < 0,0001$), HER2-статус ($p = 0,014$) и интегральный морфологический показатель – суммарный балл злокачественности ($p < 0,0001$) [33–35].

Биологические подтипы рака молочной железы как предикторы метастатического поражения лимфатических узлов

РМЖ является генетически гетерогенным заболеванием, что обуславливает разнообразие его морфологических и клинических фенотипов. Идентификация молекулярных подтипов РМЖ привела к большему пониманию особенностей течения заболевания, поскольку эти подтипы, как показано, коррелируют с ответом на проводимую терапию [36, 37] и с общей выживаемостью пациенток [38]. Однако влияние биологического подтипа на лимфогенное метастазирование однозначно не определено, результаты многих исследований противоречивы.

Статистически значимая взаимосвязь между молекулярными подтипами РМЖ и наличием метастатического поражения аксиллярных ЛУ выявлена в 2017 г. учеными из Швеции. Результаты проведенного многофакторного регрессионного анализа стали основой построения номограммы по предоперационному определению статуса подмышечных ЛУ [39]. На основании полученных данных трижды негативный подтип (ER–, PR–, HER2/neu–) характеризовался низкой склонностью к поражению подмышечных ЛУ (в 5 раз реже по сравнению с люминальным подтипом А); люминальный В/HER2–, люминальный В/HER2+ и HER2+ подтипы имели схожие между собой показатели при оценке риска лимфогенного метастазирования.

Результаты исследования, проведенного в Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, 2009 г.) и включившего 6072 пациентки, также продемонстрировали, что базальный подтип РМЖ, несмотря на плохой прогноз, имеет более низкую частоту поражения подмышечных ЛУ (отношение рисков (ОР) 0,7; 95 % ДИ 0,5–0,8) [15]. В этом же исследовании в группе HER2-положительного рака вероятность регионарного метастазирования по сравнению с другими подтипами возрастала в 2 раза, к тому же имелась склонность к множественному (>4) вовлечению ЛУ (ОР 2,0; 95 % ДИ 1,4–2,8). S.J. Grabb и соавт. в 2008 г. провели анализ 4046 образцов РМЖ и выявили аналогичную закономерность в отношении базального подтипа [30], однако в их работе оказалось, что HER2-положительный РМЖ не увеличивает вероятность регионарного метастази-

рования по сравнению с люминальным подтипом А. В работе S. Ugras и соавт., напротив, HER2-положительный подтип (как люминальный, так и нелюминальный) выступил в качестве независимого предиктора массивного поражения подмышечных ЛУ по сравнению с люминальным подтипом А в группе пациенток с pN1-стадией заболевания [40].

В литературе пока не накоплено достаточного количества однозначных данных, на основании которых можно было бы утверждать, какую же роль играет молекулярный подтип в лимфогенной диссеминации опухоли. Результаты исследования T. Jones и соавт. и вовсе не показали статистической связи молекулярного подтипа РМЖ со статусом регионарных ЛУ [41].

Экспрессия генов и лимфогенное метастазирование рака молочной железы

В последнее время выявление закономерностей экспрессии генов в целях более точного и максимально индивидуализированного прогноза как риска заболевания, так и течения РМЖ, стало одной из наиболее актуальных задач онкологии. Спектр изучаемых генов крайне широк, и в некоторых работах появляются данные о связи экспрессии тех или иных генов с лимфогенной диссеминацией первичной опухоли молочной железы.

Изучение влияния экспрессии генов из группы регуляторов апоптоза (*BCL-2*, *BAX*, *BAD*, *NDRG1*, *BIRC*, *TERT* и др.) на лимфогенное метастазирование РМЖ является интересным и перспективным направлением. Считают, что основной механизм регуляции апоптоза с помощью белков семейства BCL-2 заключается в контроле высвобождения цитохрома С из митохондрий за счет изменения проницаемости мембраны. BAD (Bcl2-associated death promoter) в нефосфорилированной форме проникает в митохондрии и приводит к высвобождению цитохрома С. Белок BAD может также образовывать димеры с белками BCL-XL или BCL-2, нейтрализуя их защитный эффект и приводя к запуску апоптоза в клетке. В. Yu и соавт. исследовали связь экспрессии BCL-2 и BAD в инвазивном РМЖ с гистологическими характеристиками первичной опухоли и наличием метастазов в ЛУ. Авторы выявили статистически значимую обратную корреляцию экспрессии BCL2 со степенью злокачественности рака, а также с наличием метастатического поражения регионарных ЛУ. В отношении гена BAD статистически достоверных результатов не получено [42].

Кодируемый геном *BIRC5* сурвивин (survivin) является членом семейства белков – ингибиторов апоптоза (IAP) и принимает участие в контроле деления клеток. Его антиапоптотическая функция связана со способностью прямого или косвенного ингибирования каспаз. Повышение экспрессии *BIRC5* наблюдается при раке легкого, толстой кишки, желудка, пищевода и поджелудочной железы, а также РМЖ, кроме того, отмечается связь данного гена с плохим

прогнозом заболевания [43]. В работе F.S. Al-Joudi и соавт. экспрессия сурвивина выявлена в 68,1 % (260/382) образцов инвазивного протокового РМЖ и статистически достоверно коррелировала с повышением частоты метастатического поражения ЛУ [44]. Вместе с тем в 2012 г. М. Adamkov и соавт. не обнаружили статистически значимой взаимосвязи экспрессии сурвивина и наличия метастазов в регионарных ЛУ ни при протоковом РМЖ [45], ни при дольковой карциноме [46].

Помимо «дикого типа» (wild-type) сурвивина, представляющего собой первичный транскрипт, в настоящее время идентифицированы еще 6 сплайсированных вариантов [47]. К ним относятся сурвивин-ΔEx3, сурвивин-2b, сурвивин-3b, сурвивин-2a, сурвивин-2b+32, сурвивин-image. Изоформы сурвивина имеют разное распределение внутри клетки, что обуславливает их различный антиапоптотический потенциал. «Дикий тип» сурвивина, сурвивин-ΔEx3 и сурвивин-3b обладают антиапоптотическими свойствами. Кроме этого, их способность к образованию гетеродимеров ведет к формированию функционально различных сурвивиновых комплексов. Например, коэкспрессия «дикого типа» сурвивина и сурвивина-ΔEx3 приводит к фиксации данного комплекса в митохондриях, где они ингибируют митохондриальнозависимый апоптоз [48]. Димеризация сурвивина-2b и «дикого типа» сурвивина приводит к снижению антиапоптотических эффектов последнего, что, вероятно, указывает на проапоптотическую активность сурвивина-2b ввиду наличия усеченного домена BIR. Сурвивин-2a также характеризуется проапоптотическими свойствами, так как вовсе не имеет домена, отвечающего за угнетение апоптоза.

Исследование экспрессии транскрипционных вариантов сурвивина при РМЖ в последнее время является популярным направлением, и в ряде работ продемонстрирована корреляционная связь тех или иных изоформ с клинико-морфологическими параметрами опухоли. Так, А.М. Athanassiadou с соавт. выявили, что повышенная экспрессия «дикого типа» сурвивина в первичной опухоли молочной железы коррелирует с крупными размерами опухолевого узла, высокой степенью злокачественности, а также с большей частотой метастатического поражения ЛУ [49]. Уровни матричной РНК первичного транскрипта сурвивина и сурвивина-ΔEx3 в исследовании P.N. Span и соавт. оказались выше в опухолях с высокой степенью злокачественности. Кроме этого, в данном исследовании выявлено, что опухоли с наличием метастазов в большем количестве ЛУ (4–9) характеризовались сниженной экспрессией сурвивина-2b, в отличие от опухолей с метастатическим поражением менее 3 ЛУ [50].

SIRT1 (SIRTUIN, SIR2-ALPHA) – семейство NAD⁺-зависимых белков, обладающих деацетилазной активностью. SIRT1 регулирует транскрипцию, репликацию и репарацию ДНК и напрямую взаимодейству-

ет с геном *p53*, который имеет мультифункциональное значение в онкогенезе, в том числе регулирует апоптоз [51].

В 2015 г. Н. Kim и соавт. исследовали экспрессию SIRT1, а также определяли прогностическую значимость ряда апоптозассоциированных факторов (Araf-1, BCL-2, Caspase-3, Caspase-9) при люминальном подтипе А РМЖ. Оказалось, что только снижение экспрессии Araf-1, Caspase-3 и SIRT1 статистически достоверно коррелировало с более высоким риском поражения ЛУ [52].

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство цинкзависимых протеаз. ММП-2 и ММП-9 в основном секретируются опухолевыми клетками и стромальными клетками в форме проэнзимов. После активации посредством гидролиза ММП-2 и ММП-9 разрушают коллаген (IV типа) базальной мембраны и межклеточный матрикс. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что ММП-2 и ММП-9, наряду с некоторыми другими представителями семейства и их природными ингибиторами, играют значимую роль в процессах инвазии и метастазирования самых различных типов злокачественных новообразований.

По данным ряда исследований, уровни экспрессии ММП-2 и ММП-9 в опухолевых тканях молочной железы значительно выше, чем в нормальной ткани, фиброаденоме и неинвазивных формах рака [53].

Н. Li и соавт. исследовали экспрессию матричной РНК ММП-2 и ММП-9 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в образцах ткани РМЖ, а также связь экспрессии данных генов с клинико-морфологическими данными. В результате выявлена статистически значимая взаимосвязь повышенной экспрессии ММП-2 и ММП-9 с наличием у пациенток метастазов в ЛУ и III–IV стадиями заболевания [54].

Доступность определения уровня ММП, а также других маркеров в сыворотке периферической крови открывает потенциальные возможности неинвазивной оценки статуса ЛУ при РМЖ. Многие авторы выявили корреляцию уровней различных ММП, определяемых в крови, с прогнозом заболевания [55–57]. В 2016 г. группой ученых из Китая проведено исследование по определению целого ряда маркеров в сыворотке периферической венозной крови больных РМЖ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-9, ММП-13, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-12, IL-17a, IFN-γ, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL9, CXCL10, G-CSF, GM-CSF, HGF, PGF (PDGF) – AA, PDGF-BB, EGF, FGF-basic) и их взаимосвязи с наличием метастазов в подмышечных ЛУ. ММП-1, фактор роста гепатоцитов (HGF), и хемокиновый лиганд 5 (CCL5) оказались независимыми факторами риска метастатического поражения ЛУ [58].

Гены, контролирующие процессы клеточного цикла и пролиферации, принимают непосредственное участие в опухолевой прогрессии. Белок циклина B1,

кодируемый геном *CCNB1*, является членом семейства циклинов, специфически регулирующих переход клетки от G2-фазы клеточного цикла к фазе митоза. Гиперэкспрессия данного гена ускоряет прогрессию клеточного цикла, повышая тем самым митотическую активность клеток. Повышение уровня экспрессии циклина В1 выявлено при различных злокачественных опухолях, и в некоторых из этих исследований данный белок определен в качестве фактора плохого прогноза. Учеными из Японии продемонстрирована статистически значимая связь экспрессии циклина В1 с повышением риска лимфогенного метастазирования у больных РМЖ [59].

Семейство транскрипционных факторов GATA в норме имеет решающее значение в дифференцировке люминального эпителия молочной железы. GATA-3 участвует в онкогенезе, наиболее высокие уровни экспрессии данного гена наблюдаются в гормоноположительном РМЖ [60].

FOXA1 (forkhead-box protein A1, или HNF3 α) – фактор транскрипции, экспрессирующийся во многих органах, включая молочную железу, способный связываться с промоторами более 100 генов, ассоциированных с метаболическими процессами, регулированием сигнальных путей и клеточного цикла. FOXA1 принимает участие во всех ER-опосредованных этапах развития РМЖ [61]. Экспрессия FOXA1 коррелирует с экспрессией GATA-3 при ER-положительном РМЖ, а наличие полноценного GATA-3/FOXA1/ER-взаимодействия обуславливает гормональную чувствительность опухоли и благоприятный прогноз [62].

По данным R. Mehra и соавт., снижение экспрессии GATA-3 в первичной опухоли РМЖ сопряжено с возрастанием частоты лимфогенного метастазирования, аналогичные выводы сделаны авторами и в отношении гена *FOXA1* [63, 64]. Y. Hisamatsu и соавт. выявили, что снижение уровня экспрессии GATA-3 и FOXA1 при ER-положительном/HER2-отрицательном РМЖ обратно коррелирует со степенью злокачественности и уровнем Ki-67, но вместе с тем авторы не обнаружили статистически значимой связи уровней экспрессии GATA-3 и FOXA1 со статусом подмышечных ЛУ [65].

Огромный спектр генов, связь которых с прогнозом РМЖ сейчас активно изучается, остался за рамками данного обзора, и, вероятно, часть из них может оказаться потенциально важными при оценке риска лимфогенного метастазирования. К ним относятся гены, контролирующие пролиферацию (*STK15, MYBL2*), инвазию (*CTSL, Stromelysin3*), эпидермальные факторы роста (*EGF, GRB7, ERBB2*), *TP53, MAP3K1, HOXB13, IL17BR, RANX1, NF1, MDM2* и многие другие.

Уместно было бы отметить, что изучение влияния комплекса генов, различных их комбинаций наряду с изучением свойств одного гена может внести большой вклад в понимание особенностей течения опухолевого процесса. Именно поэтому мультигенные сигнатуры обладают неоспоримой прогностической и предиктивной ценностью. Генные сигнатуры 1-го поколения (Oncotype DX, MammaPrint, Genomic Grade Index), ориентированные на прогнозирование ранних рецидивов РМЖ, равно как и более новые тесты (Prosigna, EndoPredict, Breast Cancer Index), обладающие большей прогностической значимостью для поздних рецидивов, направлены на формирование групп риска системного прогрессирования заболевания, но не регионарного. Отсутствие определенной панели генетических маркеров, достоверно коррелирующих со склонностью опухоли к лимфогенному метастазированию, ведет к тому, что статус ЛУ как наиболее важный независимый прогностический фактор не имеет своего «молекулярного отпечатка» в современных мультигенных сигнатурах [66].

Заключение

На данный момент накоплен достаточно большой опыт по изучению механизмов и факторов, способствующих лимфогенному метастазированию РМЖ. Во многих исследованиях продемонстрирована взаимосвязь тех или иных характеристик первичной опухоли с ее метастатическим потенциалом. Вместе с тем данное направление требует активной, углубленной работы, так как пока не выделены надежные молекулярные маркеры, при анализе которых можно было бы с высокой степенью достоверности определять статус ЛУ каждой конкретной пациентки и максимально индивидуализировать объем хирургического лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2017. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2017. 250 p. (In Russ.)].
2. Petrek J.A., Senie R.T., Peters M., Rosen P.P. Lymphedema in a cohort of breast carcinoma survivors 20 years after diagnosis. *Cancer* 2001;92(6):1368–77. PMID: 11745212.
3. Silberman A.W., McVay C., Cohen J.S. et al. Comparative morbidity of axillary lymph node dissection and the sentinel lymph node technique: Implications for patients with breast cancer. *Ann Surg* 2004;240(1):1–6. PMID: 15213610.
4. Wilke L.G., McCall L.M., Posther K.E. et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. *Ann Surg Oncol* 2006;13(4):491–500.

- DOI: 10.1245/ASO.2006.05.013.
PMID: 16514477.
5. Mansel R.E., Fallowfield L., Kissin M. et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: The ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(9):599–609. DOI: 10.1093/jnci/djj158. PMID: 16670385.
 6. Fisher B., Slack N.H., Bross I.D. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 1969;24(5):1071–80. PMID: 5353940.
 7. Chua B., Ung O., Taylor R. et al. Frequency and predictors of axillary lymph node metastases in invasive breast cancer. *ANZ J Surg* 2001;71(12):723–8. PMID: 11906387.
 8. Chen M., Palleschi S., Khoynezhad A. et al. Role of primary breast cancer characteristics in predicting positive sentinel lymph node biopsy results: a multivariate analysis. *Arch Surg* 2002;137(5):606–9. PMID: 11982477.
 9. Harden S.P., Neal A.J., Al Nasiri N. et al. Predicting axillary lymph node metastases in patients with T1 infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Breast* 2001;10(2):155–9. DOI: 10.1054/brst.2000.0220. PMID: 14965577.
 10. Brenin D.R., Manasseh D.M., El-Tamer M. et al. Factors correlating with lymph node metastases in patients with T1 breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8(5):432–7. PMID: 11407518.
 11. Vlastos G., Rubio I.T., Mirza N.Q. et al. Impact of multicentricity on clinical outcome in patients with T1–2, N0–1, M0 breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2000;7(8):581–7. PMID: 11005556.
 12. Michaelson J.S., Silverstein M., Wyatt J. et al. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. *Cancer* 2002;95(4):713–23. DOI: 10.1002/cncr.10742. PMID: 12209713.
 13. Viale G., Zurrada S., Maiorano E. et al. Predicting the status of axillary sentinel lymph nodes in 4351 patients with invasive breast carcinoma treated in a single institution. *Cancer* 2005;103(3):492–500. DOI: 10.1002/cncr.20809. PMID: 15612028.
 14. Andea A.A., Bouwman D., Wallis T., Visscher D.W. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* 2004;100(1):20–7. DOI: 10.1002/cncr.11880. PMID: 14692020.
 15. Wiechmann L., Sampson M., Stempel M. et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol* 2009;16(10):2705–10. DOI: 10.1245/s10434-009-0606-2. PMID: 19593632.
 16. Волченко Н.Н. Морфологические факторы прогноза при раке молочной железы. *Российский онкологический журнал* 2000;(3):49–53.
 - [Volchenko N.N. Morphological factors of prognosis in breast cancer. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = Russian Cancer Journal* 2000;(3):49–53. (In Russ.)].
 17. Chen Z., Yang J., Li S. et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: a special histological type compared with invasive ductal carcinoma. *PLoS One* 2017;12(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0182397. PMID: 28863134.
 18. Papadatos G., Rangan A.M., Psarianos T. et al. Probability of axillary node involvement in patients with tubular carcinoma of the breast. *Br J Surg* 2001;88(6):860–4. DOI: 10.1046/j.0007-1323.2001.01779.x. PMID: 11412259.
 19. Maibenco D.C., Weiss L.K., Pawlish K.S., Severson R.K. Axillary lymph node metastases associated with small invasive breast carcinomas. *Cancer* 1999;85(7):1530–6. PMID: 10193943.
 20. Winchester D.J., Sahin A.A., Tucker S.L., Singletary S.E. Tubular carcinoma of the breast: predicting axillary nodal metastases and recurrence. *Ann Surg* 1996;223(3):342–7. PMID: 8604915.
 21. Wong S.L., Chao C., Edwards M.J. et al. Frequency of sentinel lymph node metastases in patients with favorable breast cancer histologic subtypes. *Am J Surg* 2002;184(6):492–8. PMID: 12488144.
 22. Wilson A.R.M. Over-diagnosis and breast cancer screening. *Eur J Cancer Suppl* 2006;4(2):6.
 23. Rosen P.P., Wang T.Y. Colloid carcinoma of the breast. Analysis of 64 patients with long term follow up. *Am J Clin Pathol* 1980;73:304.
 24. Rasmussen B.B., Carsten R., Christensen I.B. Prognostic factors in primary mucinous breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1987;87(2):155–60. PMID: 3028120.
 25. Anan K., Mitsuyama S., Tamae K. et al. Pathological features of mucinous carcinoma of the breast are favourable for breast-conserving therapy. *Eur J Surg Oncol* 2001;27(5):459–63. DOI: 10.1053/ejso.2001.1142. PMID: 11504516.
 26. Pedersen L., Zedeler K., Holck S. et al. Medullary carcinoma of the breast: prevalence and prognostic importance of classical risk factors in breast cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A(13–14):2289–95. PMID: 8652258.
 27. Clarijs R., Ruiter D.J., de Waal R.M. Lymphangiogenesis in malignant tumours: does it occur? *J Pathol* 2001;193(2):143–6. DOI: 10.1002/path.808. PMID: 11180158.
 28. Pathak A.P., Bhujwalla Z.M., Pepper M.S. Visualizing function in the tumor-associated lymphatic system. *Lymphat Res Biol* 2004;2(4):165–72. DOI: 10.1089/lrb.2004.2.165. PMID: 15650386.
 29. Gujam F.J., Going J.J., Edwards J. et al. The role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival and methods of detection in patients with primary operable breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;89(2):231–41. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.014. PMID: 24075309.
 30. Crabb S.J., Cheang M.C., Leung S. et al. Basal breast cancer molecular subtype predicts for lower incidence of axillary lymph node metastases in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008;8(3):249–56. DOI: 10.3816/CBC.2008.n.028. PMID: 18650155.
 31. Klevesath M.B., Pantel K., Agbaje O. et al. Patterns of metastatic spread in early breast cancer. *Breast* 2013;22(4):449–54. DOI: 10.1016/j.breast.2013.04.017. PMID: 23726130.
 32. Zhang S., Zhang D., Yi S. et al. The relationship of lymphatic vessel density, lymphovascular invasion, and lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(2):2863–73. DOI: 10.18632/oncotarget.13752. PMID: 27926511.
 33. Родионов В.В., Панченко С.В., Идрисова С.Р. и др. Номограмма для прогнозирования вероятности метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы. *Вопросы онкологии* 2015;(3):435–8. [Rodionov V.V., Panchenko S.V., Idrisova S.R. et al. Nomogram for predicting the probability of metastatic lesion of regional lymph nodes in patients with breast cancer. *Voprosy onkologii = Oncology Questions* 2015;(3):435–8. (In Russ.)].
 34. Rodionov V., Panchenko S., Voronov Y. et al. Predicting axillary metastasis in breast cancer patients without axillary surgery: a new nomogram. *Eur J Cancer* 2014;50(2):140.
 35. Rodionov V., Cometova V., Panchenko S. et al. A new nomogram to predict axillary metastasis in breast cancer patients without axillary surgery. *Cancer Res* 2015;75(9):1–30.
 36. Brenton J.D., Carey L.A., Ahmed A.A., Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005;23(29):7350–60. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.3845. PMID: 16145060.
 37. Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5678–56. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2421. PMID: 16115903.

38. Reis-Filho J.S., Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011;378(9805):1812–23. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61539-0. PMID: 22098854.
39. Dihge L., Bendahl P.O., Ryden L. Nomograms for preoperative prediction of axillary nodal status in breast cancer. *Br J Surg* 2017;104(11):1494–505. DOI: 10.1002/bjs.10583. PMID: 28718896.
40. Ugras S., Stempel M., Patil S., Morrow M. Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status predict lymphovascular invasion and lymph node involvement. *Ann Surg Oncol* 2014;21(12):3780–86. DOI: 10.1245/s10434-014-3851-y. PMID: 24952028.
41. Jones T., Neboori H., Wu H. et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 status predict lymphovascular invasion and lymph node involvement? *Ann Surg Oncol* 2013;20:2866–72.
42. Yu B., Sun X., Shen H.Y. et al. Expression of the apoptosis-related genes BCL-2 and BAD in human breast carcinoma and their associated relationship with chemosensitivity. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29(1):107. DOI: 10.1186/1756-9966-29-107. PMID: 20691103.
43. Santa Cruz Guindalini R., Mathias Machado M.C., Garicochea B. Monitoring survivin expression in cancer: implications for prognosis and therapy. *Mol Diagn Ther* 2013;17(6):331–42. DOI: 10.1007/s40291-013-0048-1. PMID: 23912862.
44. Al-Joudi F.S., Iskandar Z.A., Hasnan J. et al. Expression of survivin and its clinicopathological correlations in invasive ductal carcinoma of the breast. *Singapore Med* 2007;48(7):607–14. PMID: 17609820.
45. Adamkov M., Kajo K., Vybohova D. et al. Correlations of survivin expression with clinicomorphological parameters and hormonal receptor status in breast ductal carcinoma. *Neoplasma* 2012;59(1):30–7. PMID: 22103896.
46. Adamkov M., Vybohova D., Horacek J. et al. Survivin expression in breast lobular carcinoma: correlations with normal breast tissue and clinicomorphological parameters. *Acta Histochemica* 2013;115(5):412–7. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.10.001. PMID: 23219440.
47. Knauer S.K., Bier C., Schlag P. et al. The survivin isoform survivin-3B is cytoprotective and can function as a chromosomal passenger complex protein. *Cell Cycle* 2007;6(12):1502–9. PMID: 17582222.
48. Végran F., Boidot R., Bonnetain F. et al. Apoptosis gene signature of survivin and its splice variant expression in breast carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2011;18(6):783–92. DOI: 10.1530/ERC-11-0105. PMID: 21878572.
49. Athanassiadou A.M., Patsouris E., Tsiplis A. et al. The significance of survivin and nectin-4 expression in the prognosis of breast carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49(1):26–33. PMID: 21526486.
50. Span P.N., Tjan-Heijnen V.C., Heuvel J.J. et al. Do the survivin(BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total surviving in breast cancer? *Clin Chem* 2006;52(9):1693–700. DOI: 10.1373/clinchem.2006.071613. PMID: 16873289.
51. Luo J., Nikolaev AY., Imai S. et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001;107(2):137–48. PMID: 11672522.
52. Kim H., Lee K.H., Park I.A. et al. Expression of SIRT1 and apoptosis-related proteins is predictive for lymph node metastasis and disease-free survival in luminal A breast cancer. *Virchows Arch* 2015;467(5):563–70. DOI: 10.1007/s00428-015-1815-7. PMID: 26280894.
53. Bucan V., Mandel K., Bertram C. et al. LEF-1 regulates proliferation and MMP-7 transcription in breast cancer cells. *Genes Cells* 2012;17(7):559–67. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01613.x. PMID: 22686279.
54. Li H., Qiu Z., Li F., Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett* 2017;14(5):5865–70. DOI: 10.3892/ol.2017.6924. PMID: 29113219.
55. Kulic A., Dedic Plavetic N., Vrbancic J., Sirotković-Skerlev M. Low serum MMP-1 in breast cancer: a negative prognostic factor? *Biomarkers* 2012;17(5):416–21. DOI: 10.3109/1354750X.2012.678885. PMID: 22515421.
56. Song N., Sung H., Choi J.Y. et al. Preoperative serum levels of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and survival of breast cancer among Korean women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(8):1371–80. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0293. PMID: 22634108.
57. Sung H., Choi J.Y., Lee S.A. et al. The association between the preoperative serum levels of lipocalin-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and prognosis of breast cancer. *BMC Cancer* 2012;12:193. DOI: 10.1186/1471-2407-12-193. PMID: 22640376.
58. Wan H., Du Z., Long Q. et al. Criteria derived from serum markers can precisely evaluate axillary status in breast cancer patients. *J Surg Res* 2017;208:211–8. DOI: 10.1016/j.jss.2016.08.086. PMID: 27993212.
59. Suzuki T., Urano T., Miki Y. et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci* 2007;98(5):644–51. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00444.x. PMID: 17359284.
60. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(19):10869–74. DOI: 10.1073/pnas.191367098. PMID: 11553815.
61. Hurtado A., Holmes K.A., Ross-Innes C.S. et al. FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat Genet* 2011;43(1):27–33. DOI: 10.1038/ng.730. PMID: 21151129.
62. Badve S., Nakshatri H. Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. *J Clin Pathol* 2009;62(1):6–12. DOI: 10.1136/jcp.2008.059899. PMID: 18794199.
63. Mehra R., Varambally S., Ding L. et al. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res* 2005;65(24):11259–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2495. PMID: 16357129.
64. Mehra R.J., Jain R.K., Leung S. et al. FOXA1 is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131(3):881–90. DOI: 10.1007/s10549-011-1482-6. PMID: 21503684.
65. Hisamatsu Y., Tokunaga E., Yamashita N. et al. Impact of GATA-3 and FOXA1 expression in patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer* 2015;22(5):520–8. DOI: 10.1007/s12282-013-0515-x. PMID: 24415069.
66. Györfy B., Hatzis C., Sanft T. et al. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res* 2015;17:11. DOI: 10.1186/s13058-015-0514-2. PMID: 25848861.

Вклад авторов

Ю.А. Дергунова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

В.В. Родионов: разработка дизайна исследования;

В.К. Боженко, М.В. Дардык: обзор публикаций по теме статьи;

В.В. Кометова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Authors' contributions

Yu.A. Dergunova: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;

V.V. Podionov: developing the research design;

V.K. Bozhenko, M.V. Dardyk: reviewing of publications of the article's theme;

V.V. Kometova: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.А. Дергунова/Yu.A. Dergunova: <https://orcid.org/0000-0002-7499-2650>

В.В. Родионов/V.V. Podionov: <https://orcid.org/0000-0003-0096-7126>

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

В.В. Кометова/V.V. Kometova: <https://orcid.org/0000-0001-9666-6875>

М.В. Дардык/M.V. Dardyk: <https://orcid.org/0000-0002-4489-7660>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 28.06.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 28.06.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.

Механизмы приобретенной резистентности к анти-EGFR-препаратам при немелкоклеточном раке легкого, не связанной с мутацией T790M, и их значение в клинической практике

Е. В. Карабина¹, Л. Н. Любченко², М. М. Давыдов²

¹ГУЗ «Тулский областной онкологический диспансер»; Россия, 300053 Тула, ул. Яблочкова, 1;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Елена Владимировна Карабина kev-251@yandex.ru

Перспективы лечебных стратегий пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и наличием приобретенной резистентности к ингибиторам тирозинкиназы, не связанной с мутацией T790M, с научных позиций достаточно широки, но в рутинной клинической практике в полном объеме пока недоступны. Понимание механизмов приобретенной резистентности к ингибиторам тирозинкиназы важно для клиницистов с позиции возможностей формирования более эффективных опций 2-й и последующих линий терапии НМРЛ. Наиболее изученным и частым механизмом, обуславливающим формирование приобретенной резистентности, является возникновение мутации T790M в экзоне 20 гена EGFR. В данной статье представлены современные представления о механизмах приобретенной резистентности к ингибиторам тирозинкиназы, не связанной с мутацией T790M, кратко изложена эволюция взглядов на лечение НМРЛ, прогрессирующего на фоне применения препаратов этой группы. Принимая во внимание многогранность нерешенных вопросов и направлений дальнейших научных поисков, нельзя забывать об имеющихся результатах исследований и умении грамотного использования описанных опций в рутинной клинической практике.

Ключевые слова: приобретенная резистентность, рецептор эпидермального фактора роста, немелкоклеточный рак легкого, тирозинкиназный ингибитор EGFR, EGFR-активирующие мутации, T790M

Для цитирования: Карабина Е. В., Любченко Л. Н., Давыдов М. М. Механизмы приобретенной резистентности к анти-EGFR-препаратам при немелкоклеточном раке легкого, не связанной с мутацией T790M, и их значение в клинической практике. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):17–24.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-17-24

The mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR drugs in non-small cell lung cancer not associated with T790m mutation and their significance in clinical practice

E. V. Karabina¹, L. N. Lubchenko², M. M. Davydov²

¹Tula Regional Oncology Center Hospital; 1 Yablochkova St., Tula 300053 Russia;

²N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The prospects of treatment strategies for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) featuring the acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors, not associated with the T790M mutation, are quite vast from a scientific point of view, but in routine clinical practice they are not yet available in full. Understanding the mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors is important for clinicians from the perspective of the possibility of forming more effective options for the second and subsequent treatment of NSCLC. The most studied and frequent mechanism causing the formation of the acquired resistance is the appearance of the T790M mutation in 20 exons of the EGFR gene. This article describes the current understanding of the mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors not associated with the mutation of T790M, the evolution of views concerning the treatment of NSCLC, progressing in the course of the treatment by this group of drugs. Taking into account the diversity of unresolved issues and directions of further scientific research, we should not forget about the available research results and the ability to use the described options in routine clinical practice in a proper way.

Key words: acquired resistance, epidermal growth factor receptor, non-small cell lung cancer, tyrosine kinase inhibitors of EGFR, EGFR-activating mutations, T790M

For citation: Karabina E. V., Lubchenko L. N., Davydov M. M. The mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR drugs in NSCLC not associated with T790m mutation and their significance in clinical practice. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):17–24.

Очевидность успеха молекулярно-направленной терапии метастатического и местно-распространенного немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) в 1-й линии при наличии соответствующих драйверных мутаций на сегодняшний день не вызывает сомнений [1–5]. Однако у всех пациентов, получающих терапию ингибиторами тирозинкиназы (ИТК) 1-го поколения, через 8,0–14,7 мес неизбежно развивается резистентность [6–17], возникновение которой связывают с модификацией гена рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*) в процессе лечения ИТК, включением обходных сигнальных путей и активацией звеньев нижележащих сигнальных путей, а также с трансформацией фенотипа опухоли [18]. Чуть раньше Н.А. Ю и соавт. среди других механизмов, обуславливающих приобретенную резистентность к ИТК и не связанных с мутацией Т790М, указывали на мелкоклеточную гистологическую трансформацию, *MET*-амплификацию и *HER2*-амплификацию [19]. Еще 5 лет назад у трети больных причина развития лекарственной резистентности оставалась неизвестной [20]. D. Jackman и соавт. разработали детальные критерии оценки приобретенной, или вторичной, резистентности к ИТК, которые включают следующие позиции: предшествующую терапию ИТК в монорежиме; прогрессирование процесса в ходе продолжавшейся в течение последних 30 дней монотерапии ИТК; отсутствие промежуточной лекарственной терапии после окончания приема ИТК и перед началом последующего лечения; наличие мутации гена *EGFR*, предсказывающей чувствительность к ИТК или клинический эффект на фоне проведенного лечения, который может быть расценен как полный, частичный ответ или длительная стабилизация на протяжении 6 мес и более [21].

Наиболее изученным и частым механизмом формирования приобретенной резистентности является возникновение мутации Т790М в экзоне 20 гена *EGFR*, на которую приходится от 52 до 63 % всех случаев вторичной резистентности [19, 22–25]. В некоторых работах упоминается более широкий интервал частоты встречаемости мутации Т790М [26, 27]. С.Н. Yun и соавт. полагают, что мутация Т790М повышает аффинитет рецептора EGF к аденозинтрифосфату [28]. Ряд исследователей считают, что Т790М не дает ИТК *EGFR* связаться с рецептором EGF, так как происходит замена треонина на метионин в положении 790. Более громоздкая метиониновая цепь создает стерическое препятствие и мешает доступу препарата к участку связывания АТФ, что обеспечивает устойчивость клеток опухоли к воздействию ИТК *EGFR* [29, 30].

Примерно у 3–10 % больных происходит трансформация НМРЛ в мелкоклеточный гистологический вариант, что обуславливает развитие приобретенной резистентности к ИТК *EGFR* [19, 26]. Трансформированные опухоли демонстрируют молекулярные профили, аналогичные классической мелкоклеточной карциноме, такие как потеря RB-активности [31, 32]

и TP53-активности [32]. При этом сохраняется оригинальная *EGFR*-мутация, а *EGFR*-экспрессия резко снижается [26, 31], что обуславливает прекращение стимулирующих *EGFR*-сигналов в трансформированных клетках [31]. Полная инактивация генов *Rb* и *p53* повышает риск мелкоклеточной трансформации в 43 раза [32]. Видимо, поэтому стандартные режимы платино-содержащей химиотерапии обладают высокой эффективностью в описанной ситуации, несмотря на сохраняющуюся активирующую мутацию гена *EGFR* [26].

Не меньший интерес к потере чувствительности опухолевых клеток на фоне проводимой терапии ИТК после объективного ответа или длительной стабилизации заболевания вызывает механизм включения обходных (*MET*, *FGFR*, *HER2*, *HER3*, *IGF-1R*, *AXL*) и нижележащих сигнальных путей (*RAS*, *RAF*, *MEK*, *ERK*; *PI3K*, *AKT*, *mTOR*) [33]. Активация внутриклеточных сигналов в обход заблокированного рецептора *EGFR* (например, путем амплификации *MET*, *MAPK* или *HER2*), встречающаяся с частотой 5–12 %, может развиваться как совместно, так и независимо от статуса мутации Т790М [26]. По мнению других авторов, *MET*-амплификация является 2-м распространенным механизмом приобретенной резистентности к ИТК *EGFR* [34], независимо от мутационного статуса Т790М [35]. В более поздних работах указывалась 20 % частота встречаемости усиления активности гена *MET*, лежащего в основе приобретенной резистентности к ИТК [36, 37]. По данным G. Scagliotti и соавт., при *EGFR*-мутированном НМРЛ тирозинкиназный рецептор *MET* экспрессируется с частотой от 25 до 75 % и представляет механизм приобретенной резистентности к *EGFR*-ингибиторам [38]. Гетеродимеризация *MET* с *ErbB3* приводит к активации сигнального пути *PI3K/AKT*, что, в свою очередь, стимулирует клеточную пролиферацию и антиапоптоз [26]. Активация сигнального пути рецептора *IGF-1* и повреждения хроматина из-за воздействия деметилазы гистона *KDM5A* обуславливают обратимую резистентность к ИТК, что было определено S.V. Sharma и соавт. у ограниченной субпопуляции больных с *EGFR*-положительным НМРЛ [39].

В пределах 17 % опухолевых биоптатов пациентов с *EGFR*-мутированным НМРЛ, у которых развилась резистентность к ИТК, обнаруживаются *HER2*-гиперэкспрессия и *HER2*-амплификация [19, 40]. Однако в общей популяции при раке легкого M.G. Kris и соавт. отмечают более редкую частоту встречаемости *HER2*-мутаций в качестве онкогенных драйверов, не превышающую 3 % [41]. В противоположность раку молочной железы и раку желудка, *HER2*-гиперэкспрессия при НМРЛ не всегда соотносится с *HER2*-амплификацией, в то время как амплификации и *HER2*-мутации в целом не являются взаимоисключающими [42]. Механизм приобретенной резистентности реализуется, как и в случае *MET*-амплификации, за счет активации других сигнальных путей [43].

Одним из вариантов развития резистентности к ИТК является запуск нижележащих сигнальных каскадов, поддерживающих пролиферацию клеток (RAS-RAF-МЕК-ERK) [26]. Мутация *BRAF*, встречающаяся с частотой около 1–2 %, способна активировать данный путь и служить причиной вторичной резистентности [26, 44]. Возникновение мутации в нижележащих сигнальных путях поддерживает пролиферативный потенциал клетки даже при заблокированном и неактивном рецепторе [26]. Амплификация *MAPK1* впервые была идентифицирована D. Egan и соавт. в опухоли больного с приобретенной резистентностью к эрлотинибу [45]. Активированный сигнальный каскад PIK3-AKT-mTOR, возникающий вследствие мутации *PIK3CA*, также ответственен за формирование вторичной резистентности [26, 44].

Среди редких механизмов приобретенной резистентности встречается активация сигнальных путей через рецепторы FGFR1, -2, -3, AXL, NF-κB [44, 46–48]. Одним из важных регуляторов транскрипции генов, регулирующих клеточную пролиферацию и рост опухолевых клеток, является активация сигнального пути через рецептор NF-κB, которая ведет к формированию устойчивости к ИТК EGFR [48]. Не менее важную роль в канцерогенезе имеет рецептор тирозинкиназы AXL, который ответственен за пролиферацию, миграцию и инвазию. Активация AXL-сигнального пути осуществляется путем гиперэкспрессии AXL или за счет его лиганда GAS6. Была обнаружена корреляция экспрессии AXL с виментином, маркером эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) на клеточных линиях НМРЛ, резистентных к ИТК EGFR. В одном из исследований в 20 % образцов опухолевой ткани пациентов, резистентных к ИТК, обнаружена активация AXL, GAS6 и виментина [46, 47].

Не менее интересным представляется феномен ЭМТ, заключающийся в фенотипическом изменении клеток, которое сопровождается потерей эпителиальных маркеров и приростом мезенхимальных маркеров [49]. Данная трансформация встречается редко, не более чем в 1–2 % случаев [26, 46, 50]. В ряде работ было продемонстрировано, что ЭМТ приводит к повышенной клеточной подвижности, инвазии и резистентности *in vitro* к ИТК EGFR [51–53]. J.M. Buonato и соавт. показали эффективность применения ингибиторов ERK1/2 в целях предупреждения ЭМТ в опухолевых клетках и повышения их чувствительности к ИТК EGFR [54]. Ингибирование MEK1/2 (MAPKK1/2) приводило к повышению и сохранению в клетках НМРЛ эпителиального фенотипа, несмотря на экзогенную стимуляцию фактором роста опухоли [54].

Результаты доклинических исследований показали, что опухоли с приобретенной резистентностью к ИТК EGFR экспрессируют более высокий уровень PD-L1, чем опухоли, чувствительные к указанной группе препаратов [55]. Пациенты с *EGFR*-мутированным НМРЛ и T790M-отрицательными опухолями с большей ве-

роятностью получали выгоду от ниволумаба после лечения ИТК EGFR, что, возможно, было результатом более высокой экспрессии PD-L1, в отличие от пациентов с наличием мутации T790M [56].

Понимание механизмов резистентности к ИТК важно для клиницистов с позиции возможностей формирования более эффективных опций 2-й и последующих линий терапии НМРЛ [57]. Перспективы лечебных стратегий пациентов с НМРЛ с приобретенной резистентностью к ИТК, не связанной с мутацией T790M и трансформацией фенотипа опухоли, с научных позиций достаточно широки, но в рутинной клинической практике пока недоступны в полном объеме.

Задача преодоления резистентности к ИТК перед клиницистами стоит давно и способы ее решения с исторических позиций представляют сложные пути от комбинированного применения ИТК и химиотерапии до создания новых противоопухолевых агентов. При всей необходимости использования таргетной терапии в случаях выявления определенного молекулярно-генетического нарушения, не связанного с мутацией T790M и обуславливающего развитие приобретенной резистентности к анти-EGFR-препаратам у больных НМРЛ, не нужно забывать о том, что пока разнообразные вышеописанные механизмы не транслируются в создание революционных молекул и использование их в повседневной практике. Необходимо помнить о том, что на сегодняшний день принципиальной терапевтической опцией для пациентов с T790M-отрицательным заболеванием после ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений по-прежнему сохраняются платиновые дуплеты [58]. Кроме того, сложные механизмы динамичной поликлональности опухоли и ее метастатических очагов способны обуславливать разные виды прогрессирования заболевания. Как правило, в клинической практике прогрессирование на ИТК EGFR может носить различный характер: системная или многоочаговая прогрессия, олигопрогрессия (3 прогрессирующих очага или менее) и изолированная прогрессия в центральной нервной системе [59]. Однако стоит отметить и то, что нередко встречается медленная системная прогрессия, не сопровождающаяся клинически значимыми симптомами. Поэтому сам факт прогрессирования не всегда приводит к необходимости изменения лечебной стратегии и продолжение ИТК с отсрочкой инициации нового системного лечения при наличии индолентной формы прогрессии рекомендуется всеми ведущими онкологическими сообществами.

У больных, заболевание которых прогрессирует в виде ограниченного количества очагов метастатического поражения, использование локальных аблативных методов лечения (радиотерапия или хирургия) на данные области при продолжении ИТК EGFR является другой альтернативной лечебной опцией [60], основанной на предположении о постоянной пользе ИТК в зонах непрогрессирующего поражения [61–63].

Таким образом, при появлении метастатического очага в головном мозге или при увеличении лишь 1 очага другой локализации (олигопрогрессия) целесообразно продолжение приема ИТК EGFR с одновременной лучевой терапией (в том числе стереотаксической лучевой терапией) или в сочетании с хирургическим удалением солитарного очага.

На определенном этапе достаточно привлекательной выглядела идея создания селективного необратимого ингибитора протеинкиназы рецепторов семейства ErbB 2-го поколения, блокирующего передачу сигналов от гомо- и гетеродимеров, образованных рецепторами ErbB: EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), ErbB3, ErbB4. Необратимое ингибирование мутированного рецептора и широкий спектр активности, включающий способность ИТК 2-го поколения афатиниба блокировать HER2, а также, возможно неполная, перекрестная резистентность к 2 предыдущим средствам этой группы, позволяли предполагать улучшение результатов лечения, большую эффективность за счет усиления ингибирования сигнальных путей EGFR и более длительное сохранение эффекта по сравнению с ИТК 1-го поколения у больных EGFR-мутированным НМРЛ [64, 65]. Кроме того, в ряде работ указывалось на вовлечение рецепторов ErbB2 и ErbB3 в формирование приобретенной резистентности к ИТК 2-го поколения, сигнальные пути которых ингибируются афатинибом [10, 11, 66]. В дальнейшем выяснилось, что афатиниб показал скромную активность у пациентов с приобретенной резистентностью к обратимым ИТК 1-го поколения [67–69]. Определенная клиническая ценность продемонстрирована в нескольких исследованиях, посвященных изучению комбинации ИТК EGFR с бевацизумабом и цетуксимабом [70–73]. Кроме того, в рамках клинических исследований активно изучаются иммуноонкологические препараты (ниволумаб) и комбинации новых таргетных агентов (осимертиниб + MET-ингибитор, или MEK1/2-ингибитор) [74].

Безусловно, более очевидным и логичным представляется использование таргетной терапии при выявлении определенного молекулярно-генетического нарушения, не связанного с мутацией T790M и обуславливающего приобретенную резистентность к анти-EGFR-препаратам при НМРЛ. Показательным примером в данном случае служит однорукавное открытое исследование II фазы, включившее 24 пациента с EGFR-мутированным неплоскоклеточным раком легкого IV стадии, у которых выявлена HER2-гиперэкспрессия после прогрессирования на фоне монотерапии ИТК EGFR, получавших любую выгоду от ER2-антитела трастузумаб (2 мг/кг еженедельно, после нагрузочной дозы 4 мг/кг) в комбинации с паклитакселом 60 мг/м² [75]. В указанной работе продемонстрирована хорошая переносимость данной схемы лечения и отмечено, что трастузумаб в сочетании с паклитакселом индуцировал стабильные ответы на лечение у значительной части пациентов. Контроль заболева-

ния на протяжении 6 нед был достигнут за счет частоты объективного ответа в 46 и 63 % случаев. Данное наблюдение указывает на положительную корреляцию уровня ответа/уровня контроля над болезнью с уровнем HER2-экспрессии, а также с числом копий гена *HER2*. Медиана выживаемости в группе лечения достигла 3 лет. Однако представленный режим имеет ограниченную активность в отношении метастазов в головном мозге при изолированной мозговой прогрессии с экстрацеребральной стабилизацией или частичным ответом, наблюдавшимся в 21 % случаев. Экстрацеребральные ответы встречались в 58 % случаев [75].

Несмотря на разнообразие генетических основ развития приобретенной резистентности к ИТК EGFR, исследования последних 10 лет выявили обратимый эпигенетический механизм возникновения лекарственной устойчивости. У некоторых больных НМРЛ повторное назначение ИТК EGFR, отмененных вследствие развившейся приобретенной резистентности, спустя определенный период может вновь оказаться эффективным. Кроме того, существует небольшая доля устойчивых к ИТК EGFR опухолей, в которых отсутствуют какие-либо известные генетические повреждения. Ряд исследователей делают вывод о том, что опухолевой популяции клеток присущи не только генетическая, но и эпигенетическая гетерогенность [76, 77].

Проблема поликлональности опухоли и ее очагов неоднократно являлась триггером для проведения большого количества исследований, в которых изучались различные режимы комбинированного применения ИТК, химиотерапии и лучевой терапии. В основу закладывалась идея мультимодального воздействия на гетерогенные клоны. Результаты исследования Z. Chen и соавт. демонстрируют расхождение по статусу *EGFR* в 13,9 % случаев при биопсии различных очагов у 1 больного [78]. Авторы отмечают, что чаще (24,4 %) гетерогенными были множественные легочные образования, в 14,3 % случаев отличались первичная опухоль и отдаленные метастазы, в 10,2 % – первичная опухоль и регионарные лимфатические узлы [78]. По результатам многоцентрового рандомизированного исследования III фазы IMPRESS, ставшего первым проспективным исследованием, посвященным сравнению применения только химиотерапии и химиотерапии в сочетании с ИТК EGFR после прогрессирования НМРЛ на фоне терапии ИТК EGFR, и доказавшего отсутствие преимущества в указанных группах [79], становится очевидной большая ожидаемая польза от данного подхода в 1-й линии терапии НМРЛ с наличием активирующей мутации в гене *EGFR*, что, в свою очередь, может претендовать на отсрочку формирования приобретенной резистентности.

Информация о новых механизмах вторичной резистентности, не связанной с мутацией T790M, непрерывно обновляется и представляет собой интересный научный пласт, который позволит расширить горизонты эффективных возможностей для решения этой

сложной задачи. Ежегодно появляются новые данные, свидетельствующие о существовании ранее не описанных мутаций [14], комбинаций когда-то изученных генетических нарушений, лежащих в основе формирования резистентности к таргетной терапии НМРЛ. Несмотря на это, преодоление приобретенной резистентности к ИТК остается большой клинической проблемой [45], и во многих случаях, при кажущейся ясности механизмов ее развития, возможности рутинной практики весьма ограничены. Вероятно, предстоит решить еще много вопросов, касающихся отсрочки

формирования приобретенной резистентности, поиска новых мутаций, иммунных предикторов, влияния опухолевого микроокружения, гетерогенности первичной опухоли и ее метастазов, а также взаимодействия всех вышеперечисленных факторов, совершенствования и валидации диагностических панелей.

Многогранность нерешенных вопросов и направлений дальнейших научных поисков не должны отвлекать клиницистов от имеющихся результатов исследований и умения грамотного использования описанных опций в рутинной клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):1229–39. DOI: 10.1056/NEJMoa040938. PMID: 15118073.
- Paez J.G., Janne P.A., Lee J.C. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304(5676):1497–500. DOI: 10.1126/science.1099314. PMID: 15118125.
- Sharma S.V., Bell D.W., Settleman J., et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(3):169–81. DOI: 10.1038/nrc2088. PMID: 17318210.
- Reguart N., Remon J. Common EGFR-mutated subgroups(Del19/L858R) in advanced non-small cell lung cancer: chasing better outcomes with tyrosine-kinase inhibitors. *Future Oncol* 2015;11(8):1–13. DOI: 10.2217/fo.15.15. PMID: 25629371.
- Shi Y.K., Wang L., Han B.H. et al. First-line icotinib versus cisplatin/pemetrexed plus pemetrexed maintenance therapy for patients with advanced EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (CONVINCE): a phase 3, open-label, randomized study. *Ann Oncol* 2017;28(10):2443–50. DOI: 10.1093/annonc/mdx359. PMID: 28945850.
- Inoue A., Suzuki T., Fukuhara T. et al. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Clin Oncol* 2006;24(21):3340–6. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.4692. PMID: 16785471.
- Rosell R., Moran T., Queralt C. et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361(10):958–67. DOI: 10.1056/NEJMoa0904554. PMID: 19692684.
- Fukuoka M., Wu Y.L., Thongprasert S. et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29(21):2866–74. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.4235. PMID: 21670455.
- Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y. et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947–57. DOI: 10.1056/NEJMoa0810699. PMID: 19692680.
- Maemondo M., Inoue A., Kobayashi K. et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362(25):2380–8. DOI: 10.1056/NEJMoa0909530. PMID: 20573926.
- Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y. et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121–8.
- Sequist L.V., Yang J.C., Yamamoto N. et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013;31(27):3327–34. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.2806. PMID: 23816960.
- Mok T., Cheng Y., Zhou X. et al. Dacomitinib versus gefitinib for the first-line treatment of advanced EGFR mutation positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomized, open-label phase III trial. In: American Society of Clinical Oncology 2017.
- Zhou C., Wu Y.L., Chen G. et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicenter, open-label, randomized, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12(8):735–42. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X. PMID: 21783417.
- Wu Y.L., Zhou C., Hu C.P. et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations (LUX-lung 6): an open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(2):213–22.
- Rosell R., Carcereny E., Gervais R. et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutations-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicenter, open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239–46.
- Park K., Ton E.H., O'Byrne K. et al. Afatinib vs gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2016;17(5):577–89. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30033-X. PMID: 27083334.
- Cortot A.B., Janne P.A. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev* 2014;23(133):356–66. DOI: 10.1183/09059180.00004614. PMID: 25176972.
- Yu H.A., Arcila M.E., Rekhtman N. et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):2240–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246. PMID: 23470965.

20. Majem M., Remon J. Tumor heterogeneity: evolution through space and time in EGFR mutant non small cell lung cancer patients. *Lung Cancer Res* 2013;2(3):226–37. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.03.09. PMID: 25806236.
21. Jackman D., Pao W., Riely G.J. et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(2):357–60. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.7049. PMID: 19949011.
22. Oxnard G.R., Arcila M.E., Sima C.S. et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res* 2011;17(6):1616–22. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2692. PMID: 21135146.
23. Sun J.M., Ahn M.J., Choi Y.L. et al. Clinical implications of T790M mutation in patients with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* 2013;82(2):294–8. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.08.023. PMID: 24035188.
24. Kuiper J.L., Heideman D.A., Thunnissen E. et al. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer* 2014;85(1):19–24. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.03.016. PMID: 24768581.
25. Li W., Ren S., Li J. et al. T790M mutation is associated with better efficacy of treatment beyond progression with EGFR-TKI in advanced NSCLC patients. *Lung Cancer* 2014;84(3):295–300. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.03.011. PMID: 24685306.
26. Sequist L.V., Waltman B.A., Dias-Santagata D. et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3(75):75ra26. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002003. PMID: 21430269.
27. Yang J.C., Ahn M.J., Kim D.W. et al. Osimertinib in pretreated T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer: AURA study Phase II extension component. *J Clin Oncol* 2017;35(12):1288–96. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.3223. PMID: 28221867.
28. Yun C.H., Mengwasser K.E., Toms A.V. et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(6):2070–5. DOI: 10.1073/pnas.0709662105. PMID: 18227510.
29. Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T. et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352(8):786–92. DOI: 10.1056/NEJMoa044238. PMID: 15728811.
30. Cross D.A., Ashton S.E., Ghiorghiu S. et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014;4(9):1046–61. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0337. PMID: 24893891.
31. Niederst M.J., Sequist L.V., Poirier J.T. et al. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun* 2015;6:6377. DOI: 10.1038/ncomms7377. PMID: 25758528.
32. Lee J.K., Lee J., Kim A. et al. Clonal history and genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 2017;35(26):3065–74. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.9096. PMID: 28498782.
33. Lovly C.M. ASCO educational book, 2015:e165–173.
34. Engelman J.A., Mukohara T., Zejnullahu K. et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest* 2006;116(10):2695–706. DOI: 10.1172/JCI28656. PMID: 16906227.
35. Bean J., Brennan C., Shih J.Y. et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumours with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(52):20932–7.
36. Xu L., Kikuchi E., Xu C. et al. Combined EGFR/MET or EGFR/HSP90 inhibition is effective in the treatment of lung cancers codriven by mutant EGFR containing T790M and MET. *Cancer Res* 2012;72(13):3302–11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3720. PMID: 22552292.
37. Cben G., Noor A., Kronenberger P. et al. Synergistic effect of afatinib with su11274 in non-small-cell lung cancer cells resistant to gefitinib or erlotinib. *PLoS One* 2013;8(3):e59708. DOI: 10.1371/journal.pone.0059708. PMID: 23527257.
38. Scagliotti G. A randomized, controlled, open-label, phase 2 study of erlotinib with or without MET antibody emibetuzumab as first line treatment for EGFR-mutant NSCLC patients who have disease control after an 8-week lead-in treatment with erlotinib. ASCO 2017, abstract 9019.
39. Sharma S.V., Lee D.Y., Li B. et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010;141(1):69–80. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.027. PMID: 20371346.
40. Altavilla G.A. Occurrence of HER2 amplification in EGFR-mutant lung adenocarcinoma with acquired resistance to EGFR-TKIs. *J Clin Oncol* 2013; suppl; abstr 8047.
41. Kris G.M., Johnson B.E., Berry L.D. et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014; 311(19):1998–2006. DOI: 10.1001/jama.2014.3741. PMID: 24846037.
42. Li B.T., Ross D.S., Aisner D.L. et al. HER2 amplification and HER2 mutation are distinct molecular targets in lung cancers. *J Thorac Oncol* 2016;11(3):414–9. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.10.025. PMID: 26723242.
43. Takezawa K., Pirazzoli V., Arcila M.E. et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov* 2012;2(10):922–33. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0108. PMID: 22956644.
44. Engelman J.A., Zejnullahu K., Mitsudomi T. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316(316):1039–43. DOI: 10.1126/science.1141478. PMID: 17463250.
45. Ercan D., Xu C., Yanagita M. et al. Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2012;2(10):934–47. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0103. PMID: 22961667.
46. Zang Z., Lee J.C., Lin L. et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 2012;44(8):852–60. DOI: 10.1038/ng.2330. PMID: 22751098.
47. Byers L.A., Diao L., Wang J. et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies AXL as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 2013;19(1):279–90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1558. PMID: 23091115.
48. Bivona T.G., Heironymus H., Parker J. et al. FAS and NF- κ B signaling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature* 2011;471(7339):523–6. DOI: 10.1038/nature09870. PMID: 21430781.
49. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(6):442–54. DOI: 10.1038/nrc822. PMID: 12189386.
50. Della Corte C.M., Bellicevine C., Vicidomini G. et al. SMO gene amplification and activation of the henhog pathway as novel mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res*

- 2015;21(20):4686–97.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3319.
PMID: 26124204.
51. Thomson S., Buck E., Petti F. et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res* 2005;65(20):9455–62.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1058.
PMID: 16230409.
 52. Rho J.K., Choi Y.J., Lee J.K. et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small-cell lung carcinoma cell line. *Lung Cancer* 2009;63(2):210–26.
DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.05.017.
PMID: 18599154.
 53. Suda K., Tomizawa K., Fujii M. et al. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol* 2011;6(7):1152–61.
DOI: 10.1097/JTO.0b013e318216ee52.
PMID: 21597390.
 54. Buonato J.M., Lazzara M.J. ERK1/2 blockade prevents epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and promotes their sensitivity to EGFR inhibition. *Cancer Res* 2014;74(1):309–19.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4721.
PMID: 24108744.
 55. Lin K., Cheng J., Yang T. et al. EGFR-TKI down-regulates PD–L1 in EGFR mutant NSCLC through inhibiting NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;463(1–2):95–101.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.030.
PMID: 25998384.
 56. Haratani K., Hayashi H., Tanaka T. et al. Tumour immune microenvironment and nivolumab efficacy in igfr mutation-positive non-small-cell lung cancer based on T790m status after disease progression during EGFR-TKI treatment. *Ann Oncol* 2017;28(7):1532–9.
DOI: 10.1093/annonc/mdx183.
PMID: 28407039.
 57. Сакаева Д.Д., Гордиев М.Г. Основные механизмы резистентности к ингибиторам тирозинкиназы EGFR. *Фарматека* 2017;8(341):59–65. [Sakaeva D.D., Gordiev M.G. The main mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors EGFR. *Farmateka = Pharmateka* 2017;8(341):59–65. (In Russ.)].
 58. Girard N. Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC: which tyrosine kinase inhibitor and when? *Future oncology. Review*. www.futuremedicine.com/doi/suppl/10/2217/fon-2017-0636(Epub ahead of print).
 59. Gandara D.R., Li T., Lara P.N. et al. Acquired resistance to targeted therapies against oncogene-driven non-small-cell lung cancer: approach to subtyping progressive disease and clinical implications. *Clin Lung Cancer* 2014;15(1):1–6. DOI: 10.1016/j.clcc.2013.10.001. PMID: 24176733.
 60. Westover D., Zugazagoitia J., Cho B.C. et al. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ann Oncol* 2018;29(Supplement 1):i10–9.
DOI: 10.1093/annonc/mdx703.
PMID: 29462254.
 61. Weickhardt A.J., Scheier B., Burke J.M. et al. Local ablative therapy of oligoprogressive disease prolongs disease control by tyrosine kinase inhibitors in oncogene-addicted non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7(12):1807–14.
DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182745948.
PMID: 23154552.
 62. Yu H.A., Sima C.S., Huang J. et al. Local therapy with continued EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy as a treatment strategy in EGFR-mutant advanced lung cancers that have developed acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Oncol* 2013;8(3):346–51.
DOI: 10.1097/JTO.0b013e31827e1f83.
PMID: 23407558.
 63. Conforti F., Catania C., Toffalorio F. et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors beyond focal progression obtain a prolonged disease control in patients with advanced adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2013;81(3):440–4. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.05.019. PMID: 23810573.
 64. Solca F., Dahl G., Zoepfel A. et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;343(2):342–50. DOI: 10.1124/jpet.112.197756. PMID: 22888144.
 65. Modjtahedi H., Cho B.C., Michel M.C., Solca F. A comprehensive review of the preclinical efficacy profile of the ErbB family blocker afatinib in cancer. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014;387(6):505–21.
DOI: 10.1007/s00210-014-0967-3.
PMID: 24643470.
 66. Inoue A., Kobayashi K., Maemondo M. et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Ann Oncol* 2013;24(1):54–9.
DOI: 10.1093/annonc/mds214.
PMID: 22967997.
 67. Katakami N., Atagi S., Goto K. et al. LUX-lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol* 2013;31(27):3335–41.
DOI: 10.1200/JCO.2012.45.0981.
PMID: 23816963.
 68. Miller V.A., Hirsh V., Cadranel J. et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX–Lung 1): a phase 2b/3 randomized trial. *Lancet Oncol* 2012;13(5):528–38.
DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70087-6.
PMID: 22452896.
 69. Schuler M., Yang J.C., Park K. et al. Afatinib beyond progression in patients with advanced non-small-cell lung cancer following chemotherapy, erlotinib/gefitinib and afatinib: phase III randomized LUX–Lung 5 trial. *Ann Oncol* 2015;27:417–23.
 70. Akito Hata. Afatinib (Afa) plus bevacizumab (Bev) combination after acquired resistance (AR) to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC): Multicenter single arm phase II trial (ABC-study). Abstract 9034. Poster Session (Board #360). ASCO 2017. Clinical trial information: UMIN000014710.
 71. Rosell R., Dafni U., Felip E. et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with advanced non-small-cell lung cancer and activating EGFR mutations (BELIEF): an international, multicentre, single-arm, Phase II trial. *Lancet Respir Med* 2017;5(5):435–44.
DOI: 10.1016/S2213-2600(17)30129-7.
PMID: 28408243.
 72. Janjigian Y.Y., Smit E.F., Groen H.J. et al. Dual Inhibition of EGFR with Afatinib and Cetuximab in Kinase Inhibitor-Resistant EGFR-Mutant Lung Cancer with and without T790M Mutations. *Cancer Discov* 2014;4(9):1036–45.
DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0326.
PMID: 25074459.
 73. Horn L. Continued afatinib (A) with the addition of cetuximab (C) after progression on afatinib in patients with acquired resistance (AR) to gefitinib (G) or erlotinib (E). *Oncol Biology Physics*, 2014, 90 Suppl, Abstr 3333.
 74. Corallo S., D’Argento E., Strippoli A. et al. Treatment options for EGFR T790M-negative EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *Target Oncol* 2017;12(2):153–61.
DOI: 10.1007/s11523-017-0479-4.
PMID: 28188446.
 75. De Langen A. Trastuzumab and paclitaxel in patients with EGFR mutated NSCLC that express HER2 after progression on EGFR TKI treatment. ASCO 2017, abstract 9042.
 76. Brock A., Chang H., Huang S. Non-genetic heterogeneity a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nat Rev Genet* 2009;10(5):336–42.
DOI: 10.1038/nrg2556.
PMID: 19337290.

77. Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G. et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146(4):633–44. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.026. PMID: 21854987.
78. Chen Z., Zhong W.Z., Zhang X.C. et al. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *Oncologist* 2012;17(7):978–85. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0385. PMID: 22673630.
79. Soria J.C., Wu Y.L., Nakagawa K. et al. Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2015;16(8):990–8. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00121-7. PMID: 26159065.

Вклад авторов

Е.В. Карабина: разработка плана работы, сбор информации о состоянии вопроса, поиск литературы, анализ документов, обобщение информации, сравнение информации из разных источников, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Л.Н. Любченко: корректное определение предмета и темы, обогащение документации путем личных обменов, подбор и доступ к документам, систематизация разрозненных знаний;

М.М. Давыдов: обзор перспективных идей, выделение новых направлений исследований.

Authors' contributions

E.V. Karabina: development of the workplan, information gathering on the state of the problem, literature search, document analysis, information synthesis, comparison of information from various sources, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

L.N. Lubchenko: correct definition of the subject and theme, enrichment of documentation through personal exchange, selection and access to documents, systematization of segmental knowledge;

M.M. Davydov: review of promising ideas, identification of new research directions.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 26.06.2018. Принята к публикации: 10.08.2018.

Article received: 26.06.2018. Accepted for publication: 10.08.2018.

Медицинские работники: профессиональные канцерогенные факторы и онкологический риск

Л.Г. Соленова, Е.А. Некрасова

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

Контакты: Лия Геннадьевна Соленова lsolenova@mail.ru

Труд медицинских работников, численность которых в России составляет более 2 млн, сопряжен с экспозицией к вредным производственным факторам физической, химической и биологической природы, действующим в комплексе с высокими психоэмоциональными нагрузками. Данные масштабных эпидемиологических исследований, проведенных в разных странах, свидетельствуют о повышенном риске злокачественных новообразований у врачей и медицинских сестер: рака молочной железы, кожи, головного мозга и других локализаций. Повышенный риск злокачественных новообразований легкого, молочной железы, матки, яичников, головного мозга связывают с воздействием на медицинский персонал ионизирующего излучения. Экспозиция к цитостатикам повышает у медицинских работников-женщин риск врожденных пороков развития у детей, спонтанных аборт, рака молочной железы. В России отмечается тенденция нарастания числа аварийных ситуаций, связанных с производственными травмами, ведущими к нарушению кожных покровов и чреватых заражением медицинского персонала трансмиссивными инфекциями, несущими канцерогенный риск (вирусами гепатита В и С, вирусом иммунодефицита человека). Занятость медицинских работников в ночных сменах ведет к нарушению репродуктивной функции, гиперпластическим процессам в молочной железе и матке, повышенному риску развития рака молочной железы. Необходимы отечественные эпидемиологические исследования онкологического риска у медицинских работников, оценки численности медицинских контингентов, подвергающихся воздействию канцерогенных агентов на рабочем месте для разработки адекватных мер профилактики рака.

Ключевые слова: медицинский работник, профессиональная экспозиция, профессиональная группа, онкологический риск, онкопрофилактика

Для цитирования: Соленова Л.Г., Некрасова Е.А. Медицинские работники: профессиональные канцерогенные факторы и онкологический риск. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):25–39.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-25-39

Healthcare workers: occupational carcinogenic factors and cancer risk

L.G. Solenova, L.A. Nekrasova

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

The number of healthcare workers is over two million in Russia. Many of them are exposed to hazardous physical, chemical and biological occupational factors acting along with psychological strain. The results of large epidemiological studies carried out in various countries revealed greater cancer risk in physicians and nurses: cancer of the breast, skin, brain and other sites. Higher cancer risk of lung, breast, uterine, ovary, brain is considered to be associated with ionizing radiation. The female healthcare workers who handle antineoplastic drugs showed a greater risk of birth defects in offspring, spontaneous abortions and breast cancer. In Russia, the growing number of accidents among healthcare workers following transmission of infection by carcinogenic biological factors such as HBV and HIV is observed. Higher risk of reproductive impairments, hyperplasia of the breast and uterine tissues, breast cancer are revealed in nurses working the night shift. In Russia, there is lack of epidemiological studies of cancer risk among healthcare workers, the number of medical personal exposed to occupational carcinogens is unknown. That all does not show the actual situation in our country and does not allow setting priorities in cancer prevention among medical workers.

Key words: healthcare worker, occupational exposure, occupational group, cancer risk, oncoprevention

For citation: Solenova L.G., Nekrasova L.A. Healthcare workers: occupational carcinogenic factors and cancer risk. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(3):25–39.

В России, по статистическим данным, численность врачей в 2015 г. составила 673 тыс. человек, среднего медицинского персонала – 1550 тыс. [1]. Труд медицинских работников принадлежит к числу наиболее сложных и ответственных видов деятель-

ности человека. Он характеризуется значительной интеллектуальной нагрузкой, а в отдельных случаях требует больших физических усилий, выносливости, внимания и высокой трудоспособности в экстремальных условиях.

Факторы, опасные для здоровья и способные вызывать профессиональные заболевания у медицинских работников, имеют разную природу:

- физические (ионизирующее и неионизирующее излучение, ультразвук, лазерное излучение, шум, вибрация и т. д.);
- химические (высокоактивные лекарственные препараты, включая канцерогенные цитостатики);
- биологические (патогенные микроорганизмы, в том числе отнесенные к доказанным канцерогенным факторам: вирусы гепатита В и С и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), многочисленные вирусы папилломы человека);
- нервно-эмоциональные (интеллектуальное и эмоциональное напряжение, сменная работа, часто при дефиците времени и в экстремальных ситуациях).

В связи с воздействием различных канцерогенных факторов закономерен интерес к онкологической заболеваемости и смертности медицинских работников.

Онкологическая заболеваемость и смертность медицинских работников

Результаты эпидемиологических исследований, проведенных в разных странах, начиная с 1-й половины XX века, и более поздних, захватывающих XXI век, свидетельствуют о том, что общая смертность медицинского персонала, особенно врачей, ниже популяционной или находится на одном с ней уровне. Предположительно, в значительной степени это объясняется отбором в профессию врачей лиц среднего и высокого социально-экономического статуса с изначально хорошими показателями здоровья, меньшей распространенностью вредных привычек, большей доступностью качественного медицинского обслуживания [2–6].

Результаты изучения онкологической заболеваемости и смертности медицинского персонала, полученные в разных странах, во многом совпадают, что может свидетельствовать о вовлеченности общих профессиональных факторов в канцерогенез у медицинских работников. Стоит остановиться на наиболее масштабных исследованиях.

Существующая в скандинавских странах система присвоения при рождении идентификационного номера каждому жителю, по которому он идентифицируется во всех регистрах, в том числе в регистре профессиональной занятости и канцер-регистре, позволяет проводить эпидемиологические исследования в больших профессиональных контингентах. В 5 северных странах (Норвегия, Финляндия, Швеция, Дания и Исландия) изучался риск 49 локализаций злокачественных новообразований (ЗН) в 53 профессиональных группах по данным объединенной системы регистров, связанных с переписями населения. Когорта включала 15 млн лиц в возрасте 30–64 лет, онкологическая заболеваемость которых была прослежена в течение 45 лет (1961–2005 гг.). С учетом большого объема

исследования и длительности наблюдения целесообразно привести основные данные, касающиеся медицинских работников. Общая онкологическая заболеваемость в профессиональной группе врачей-мужчин была незначимо ниже ожидаемой, у женщин-врачей она была немного, но статистически значимо выше. Обращает на себя внимание значимо низкий риск развития рака легкого во всех группах и повышенный риск меланомы и рака кожи у мужчин и женщин (за исключением медбратьев), рака предстательной железы, яичка, головного мозга, неходжкинской лимфомы — у мужчин-врачей, значимо повышенный риск рака молочной железы (РМЖ) — у женщин-врачей, рака тела матки и головного мозга — у медицинских сестер (табл. 1) [7].

Результаты некоторых масштабных исследований, проведенных в разных странах, представлены в табл. 2. На Тайване в национальной когорте из 184 809 медицинских сестер, прослеженной с 2000 по 2010 г., статистически значимо выше популяционного оказался риск всех ЗН, РМЖ, рака щитовидной железы, легкого и тела матки. Значимо пониженный риск наблюдался в отношении рака шейки матки, печени и желчных путей. Снижение риска рака шейки матки авторы связывают с более частым, чем в контрольной группе, обследованием с использованием Пап-теста [8].

В Израиле ретроспективно за 1980–2007 гг. были собраны данные об онкологической заболеваемости 37 789 врачей. Когорта была разделена на врачей общей практики и врачей-клиницистов, среди которых были выделены 4 группы узких специалистов: интерны (гематологи, эндокринологи, ревматологи и др.), хирурги, педиатры и радиологи. Во всех выделенных группах общая онкологическая заболеваемость значимо не отличалась от популяционной. У врачей общей практики она была значимо ниже. Статистически значимо повышенный риск РМЖ отмечен в группе женщин-клиницистов, объединяющих все 4 группы. В объединенной группе клиницистов наблюдался повышенный риск злокачественной меланомы кожи у врачей как мужчин, так и женщин.

Это исследование интересно тем, что существенные различия обнаружались при сравнении врачей-клиницистов с врачами общей практики. У клиницистов вне зависимости от пола во всех 4 группах узких специалистов по сравнению с врачами общей практики была значимо повышена общая онкологическая заболеваемость, а также РМЖ у интернов и радиологов (стандартизованное отношение заболеваемости (СОЗ) 1,52; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,24–1,80 и СОЗ 1,47; 95 % ДИ 1,23–1,71 соответственно). У мужчин-интернов, педиатров и радиологов был значимо повышен риск рака предстательной железы, у интернов и хирургов — рака мочевого пузыря, у педиатров и хирургов — меланомы. Различия авторы объясняют занятостью госпитальных врачей в ночных сменах, что ведет к нарушению циркадных ритмов с последующим

Таблица 1. Риск злокачественных новообразований некоторых локализаций у медицинского персонала в 5 северных странах Европы (по данным [7])**Table 1.** Risk of malignant tumors of some localizations in medical staff in 5 Northern European countries (according to [7])

| Локализация Cancer site | Стандартизованное отношение заболеваемости (95 % доверительный интервал) Standardized incidence ratio (95 % confidence interval) | | | |
|--|---|-------------------------|---|-------------------------|
| | Врачи Doctors | | Средний медицинский персонал Nursing staff | |
| | мужчины men | женщины women | мужчины men | женщины women |
| Все злокачественные новообразования All sites | 0,94 (0,92–1,97) | 1,06 (1,01–1,12) | 0,87 (0,76–1,00) | 1,01 (0,99–1,02) |
| Толстая кишка Colon | 1,14 (1,05–1,24) | 1,07 (0,88–1,29) | 1,14 (0,67–1,80) | 0,99 (0,94–1,04) |
| Легкое Lung | 0,53 (0,49–0,58) | 0,63 (0,52–0,88) | 0,41 (0,67–0,73) | 0,69 (0,65–0,74) |
| Меланома Melanoma | 1,78 (1,32–2,36) | 1,10 (1,03–1,61) | 0,94 (0,55–1,54) | 1,15 (1,08–1,23) |
| Кожа Skin | 1,77 (1,60–1,97) | 2,52 (1,89–3,31) | 1,81 (0,99–3,17) | 1,12 (1,02–1,22) |
| Молочная железа Breast | 1,05 (0,52–1,85) | 1,71 (1,36–2,13) | 2,29 (0,06–12,75) | 1,18 (1,15–1,20) |
| Тело матки Uterus | | 1,19 (0,99–1,44) | | 1,08 (1,05–1,14) |
| Предстательная железа Prostate | 1,22 (1,13–1,32) | | 1,09 (0,60–1,45) | |
| Яичко Testicle | 1,48 (1,15–1,99) | | 0,91 (0,34–1,99) | |
| Головной мозг Brain | 1,32 (1,16–1,49) | 1,11 (0,86–1,41) | 1,12 (0,64–1,81) | 1,08 (1,01–1,16) |
| Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin lymphoma | 1,22 (1,08–1,39) | 1,17 (0,86–1,56) | 1,29 (0,27–3,76) | 0,95 (0,71–1,22) |

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели.

Note. Statistically significant values are presented in bold.

гормональным дисбалансом, сбоем иммунной системы, сопровождающимся выживанием и ростом злокачественных клеточных клонов [9].

Во французском госпитале с 1979 по 1994 г. была прослежена когорта из 940 врачей, проработавших в нем не менее 1 года в период 1945–1994 гг. При отсутствии различий с популяцией общей онкологической заболеваемости у врачей в 5,45 раза (95 % ДИ 2,0–11,9) оказалась повышена заболеваемость опухолями кроветворной ткани. Отсутствие данных по индивидуальной экспозиции членов когорты ограничило интерпретацию полученных высоких показателей риска [10].

Масштабные исследования онкологического риска у медицинских работников проведены и с учетом показателей смертности. Так, в США онкологическая смертность женщин, занятых в здравоохранении, бы-

ла изучена на основании анализа свидетельств о смерти за 1984–1993 гг., собранных в 24 штатах. У врачей зафиксирована значимо повышенная смертность от всех ЗН, РМЖ, рака тела матки, яичников, незначимо повышенная – от ЗН головного мозга и лейкозов. Аналогичные результаты получены для белых женщин-фармацевтов и других специалистов в области медицины. У белых медицинских сестер наблюдалось статистически значимое повышение смертности от опухолей печени, головного мозга и миелоидного лейкоза [11].

В Канаде по статистическим материалам о смертности в округе Британская Колумбия было рассчитано отношение пропорциональной смертности медицинских сестер в 1950–1984 гг. Наблюдалось статистически значимое снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и повышение от всех ЗН, а также ЗН

Таблица 2. Онкологический риск у медицинского персонала в некоторых странах

Table 2. Oncological risk in medical staff in some countries

| Характеристика исследования Study characteristic | Локализации ЗН Cancer sites | Показатель риска (95 % доверительный интервал) Risk value (95 % confidence interval) | | Страна, ссылка Country, reference |
|---|---------------------------------------|---|------------------|--------------------------------------|
| | | мужчины men | женщины women | |
| Заболеемость <i>Incidence</i> | | | | |
| Когорта: 184 809 медицинских сестер (2000–2010 гг.) Cohort: 184 809 nurses (2000–2010) | Все ЗН All sites | | 1,10 (1,05–1,15) | Тайвань [8] Taiwan [8] |
| | Легкое Lung | | 1,36 (1,13–1,62) | |
| | Молочная железа Breast | | 1,28 (1,19–1,37) | |
| | Тело матки Uterus | | 1,23 (1,01–1,49) | |
| Когорта: 37 789 врачей (1980–2007 гг.) Cohort: 37 789 doctors (1980–2007) | Щитовидная железа Thyroid | | 1,26 (1,10–1,43) | Израиль [9] Israel [9] |
| | Молочная железа Breast | – | 1,26 (1,10–1,43) | |
| Когорта: 3673 врача (1983–1998 гг.) Cohort: 3673 doctors (1983–1998) | Меланома* Melanoma* | 1,71 (1,30–2,03) | 1,89 (1,37–2,42) | Эстония [5] Estonia [5] |
| | Все ЗН All sites | 0,92 (0,73–1,13) | 1,32 (1,15–1,48) | |
| | Молочная железа Breast | 4,88 (1,58–11,38) | 2,03 (1,62–2,51) | |
| Когорта: 3673 врачей (1983–1998 гг.) Cohort: 3673 doctors (1983–1998) | Меланома Melanoma | | 3,69 (1,35–8,02) | Эстония [5] Estonia [5] |
| | Миелоидный лейкоз Myeloid leukemia | | 3,69 (1,35–8,02) | |
| Смертность <i>Mortality</i> | | | | |
| Женщины-врачи Female doctors Медицинские сестры Nurses (сертификаты смерти) (1984–1993 гг.) (death certificates) (1984–1993) | Все ЗН All sites | | 1,2 (1,1–1,5) | США [11] USA [11] |
| | Молочная железа Breast | | 1,4 (1,0–1,8) | |
| | Тело матки Uterus | | 2,3 (1,3–1,4) | |
| | Яичники Ovaries | | 2,0 (1,3–3,1) | |
| | Печень Liver | | 1,3 (1,1–1,7) | |
| | Головной мозг Brain | | 1,2 (1,1–1,3) | |
| | Миелоидный лейкоз Myeloid leukemia | | 1,3 (1,1–1,4) | |
| Медицинские сестры (материалы статистики) (1950–1984 гг.) Nurses (statistics data) (1950–1984) | Все ЗН All sites | | 1,14 (1,05–1,23) | Канада [12] Canada [12] |
| | Поджелудочная железа Pancreas | | 1,36 (1,02–1,80) | |
| | Молочная железа Breast | | 1,20 (1,03–1,40) | |
| | Яичники Ovaries | | 1,56 (1,24–1,95) | |

Примечание. ЗН – злокачественные новообразования.

*Здесь и далее злокачественная меланома кожи.

*Here and elsewhere denotes malignant melanoma of the skin.

поджелудочной и молочной желез, яичников, лейкоза [12].

Общее число и масштаб зарубежных эпидемиологических исследований, посвященных проблеме онкологического риска у медицинских работников, несопоставимы с теми немногочисленными работами, которые были проведены в СССР и России. Тем не менее следует привести их результаты. В Эстонии была прослежена когорта 3 673 врачей в течение 1983–1998 гг., т. е. периода, охватывающего последние годы существования СССР и начала существования Эстонии как самостоятельного государства. С учетом длительного латентного периода большинства ЗН можно предполагать, что в онкологической заболеваемости врачей могли найти отражение те профессиональные факторы, которые действовали на врачей в течение советского времени. Смертность от всех причин в когорте была существенно ниже популяционной (стандартизованное отношение смертности 0,55) за счет малого числа смертей от рака легкого, сердечно-сосудистых заболеваний и внешних причин. В то же время общая онкологическая заболеваемость у женщин в когорте статистически значимо превышала популяционный уровень при повышенном риске РМЖ и миелоидного лейкоза. У мужчин при общей пониженной онкологической заболеваемости (СОЗ 0,92) статистически значимо была понижена заболеваемость раком легкого и повышена – меланомой кожи. Полученные результаты совпадают с данными других исследований этой профессиональной группы. Несмотря на это, авторы не связывают обнаруженное повышение риска с действием профессиональных факторов [5].

Анализ данных Государственного комитета СССР по статистике за 1970 г. по смертности в 32 регионах страны женщин пенсионного возраста 35 профессиональных групп выявил самую высокую смертность от РМЖ именно среди медицинских работников. У врачей она была статистически значимо выше популяционного уровня в 4,2 раза, у среднего медицинского персонала – в 2,9 раза, что, по мнению автора, объясняется характером репродуктивного поведения и нервно-эмоциональными перегрузками, свойственными этой профессиональной группе [13].

В исследование случай–контроль, проведенное среди сотрудников РОНЦ им. Н.Н. Блохина, были включены 193 сотрудника с диагнозом ЗН, поставленным в 2000–2008 гг., и 383 человека контрольной группы (без ЗН), сопоставимой по полу, возрасту и стажу работы на момент постановки диагноза заболевшему лицу. У сотрудниц, имевших производственный контакт с канцерогенными факторами, наблюдалось повышение общего онкологического риска (статистически значимо в 1,8 раза), у мужчин повышение риска было статистически незначимо (в 1,2 раза). В группе операционного персонала у мужчин (хирурги, анестезиологи, реаниматологи) был повышен общий онкологический риск (относительный риск (ОР) 3,4; 95 %

ДИ 1,5–7,8), а также риск рака прямой и толстой кишки (ОР 8,4; 95 % ДИ 1,2–66,2) [14].

Результаты ряда исследований, проведенных в разных странах в 80–90-е годы прошлого века, выявили повышенный риск опухолей головного мозга у врачей, стоматологов и среднего медицинского персонала. Предполагалось, что он объясняется большей доступностью для них диагностических процедур. Однако с растущей распространенностью и доступностью компьютерной и магнитно-резонансной томографии существенное влияние этого фактора на данные, полученные в последующие годы, маловероятно [15–17].

В большинстве исследований прослеживается повышение риска РМЖ у женщин и меланомы кожи у медицинских работников вне зависимости от пола. Повышение риска РМЖ связывают с действием таких профессиональных факторов, как ионизирующее излучение, занятость в ночных сменах, а также с репродуктивным поведением, на характер которого может накладываться отпечаток профессия, в частности поздний возраст первых родов, короткий период грудного вскармливания, малодетность. Повышение риска меланомы у медицинских работников объясняют не профессиональным рутинным ультрафиолетовым облучением, а интенсивной солнечной инсоляцией во время отдыха, сопровождающейся ожогами.

В приведенных выше работах изучался онкологический риск во всей профессиональной группе врачей или медицинских сестер. Гетерогенность профессиональной экспозиции медицинских работников осложняет интерпретацию возможных связей, а объединение для анализа в большие группы лиц с различной профессиональной экспозицией может маскировать связанные с ней риски. Поэтому интерес представляют исследования, оценивавшие риск в группах медицинских работников, экспонированных к наиболее значимым производственным факторам риска: ионизирующему излучению, обращению с канцерогенными химиопрепаратами, канцерогенным биологическим факторам, ночным сменам, психоэмоциональному напряжению.

Ионизирующее излучение

Лучевые методы обследования и лечения широко применяются во многих областях медицины. Первое убедительное эпидемиологическое доказательство стохастических эффектов облучения основано на исследовании 1944 г. профессионального воздействия рентгеновского облучения, результаты которого показали существенное повышение риска лейкозов среди рентгенологов США. Отсутствие записей об уровнях воздействия в ранние периоды использования рентгеновского излучения не дает возможности определить риск на единицу дозы, полученной медицинскими работниками [18]. Онкологическая смертность британских рентгенологов, вошедших в профессию до 1921 г., на 75 % превышала таковую среди врачей других

специальностей. Статистически значимо выше была смертность от рака поджелудочной железы, легкого, кожи и лейкозов. Точную оценку полученной ими лучевой нагрузки определить невозможно. Среди приступивших к работе в период 1920–1945 гг. аккумулятивная доза составляла около 1–5 Гр (100–500 рад) в год. Для экспонированного медицинского персонала, работавшего до 1950 г., показано повышение риска лейкозов, рака кожи и РМЖ. В последующий период отмечена противоречивость доказательств связи онкологического риска с этим профессиональным фактором [19].

Новый раздел рентгенологии, формирование которого началось в 70-е годы прошлого столетия, – интервенционная радиология – охватывает широкий круг диагностических процедур и хирургических интервенционных вмешательств под контролем лучевого фактора. В хирургическую практику различных областей медицины постоянно вводятся радиологические процедуры, связанные с применением новых лучевых технологий: цифровая рентгенография, флюорография, ультразвуковые исследования, рентгеновская компьютерная и магнитно-резонансная томография [20]. В диагностических и лечебных манипуляциях под лучевым контролем помимо рентгенологов принимают участие хирурги, анестезиологи, травматологи, реаниматологи и средний медицинский персонал. В связи с этим расширяются профессиональные контингенты медицинских работников, объединенных воздействием на рабочем месте лучевого фактора, общего в терминологическом отношении, но разнородного по виду и уровню экспозиции, что создает трудности в ее оценке при проведении эпидемиологических исследований и дифференцировании профессионального онкологического риска.

Израильские исследователи опубликовали 31 наблюдение случаев опухолей головного мозга и шеи, диагностированных в разных странах у врачей, проводивших интервенционные процедуры. Среди них 23 кардиолога, 2 электрофизиолога и 6 радиологов. Все они имели длительную (в среднем $23,5 \pm 5,9$ года) активную интервенционную практику при воздействии лучевого фактора во время проведения катетеризации. В 85 % случаев опухоли были расположены в левой части головного мозга, которая, как известно, в большей степени подвергается воздействию, чем правая. По мнению авторов, именно это дает основание предполагать связь их развития с действующим профессиональным фактором, но обоснованность такого предположения ограничена описательным характером исследования [21].

Более убедительные доказательства дают аналитические эпидемиологические, особенно когортные, исследования. Влияние профессионального воздействия ионизирующего излучения на риск возникновения ЗН изучалось в когорте из 43 316 норвежских медицинских сестер, получивших медицинское свидетельство

в 1914–1984 гг. и прослеженных в течение 1953–2002 гг. Индикаторы профессиональной лучевой экспозиции разработаны на основании анализа профессионального маршрута. Контрольную группу составили медицинские сестры, не подвергавшиеся профессиональному воздействию ионизирующего излучения. Не обнаружено четкой связи профессиональной экспозиции к лучевому фактору с риском РМЖ, рака щитовидной железы, яичников, лейкозов, злокачественной меланомы или других опухолей кожи. Повышенный риск рака легкого на границе статистической значимости выявлен в подгруппе медицинских сестер с первым воздействием данного фактора после 1950 г. (ОР 3,41; 95 % ДИ 0,97–2,23) и медицинских сестер с периодом от первой экспозиции менее 20 лет (ОР 3,41; 95 % ДИ 1,67–6,99). По мнению авторов, наиболее вероятным объяснением этих результатов является влияние курения как мешающего фактора, и нет убедительных доказательств связи профессионального воздействия ионизирующего излучения с онкологическим риском у медицинских сестер [22].

В упомянутом выше исследовании смертности женщин в 24 штатах США у медицинских техников с экспозицией к лучевому фактору выявлен повышенный риск смерти от всех ЗН (стандартизованное отношение смертности 1,4 в границах 1,2–1,6), рака матки (2,5; 1,3–4,9), яичников (1,8; 1,2–2,8), поджелудочной железы (1,7; 1,0–2,9), легкого (1,5; 1,1–2,0), РМЖ (1,4; 1,1–1,4). На интерпретацию этих данных накладывают ограничения, обусловленные анализом сертификатов смерти, в которых не исключаются ошибки при указании профессии [11].

Повышение риска РМЖ, общепризнанным фактором риска развития которого является ионизирующее излучение, прослеживается по результатам многих эпидемиологических исследований. У финских врачей, работающих с источниками ионизирующего излучения, выявлена повышенная в 1,7 раза (95 % ДИ 1,0–3,1) частота развития РМЖ по сравнению с врачами других специальностей [23]. В приведенном выше отечественном исследовании случай–контроль у сотрудниц РОНЦ им. Блохина, работающих с источниками ионизирующего излучения, риск развития РМЖ был повышен в 3 раза, не достигая уровня статистической значимости (95 % ДИ 0,9–10,6). При малом числе имеющих наблюдений и отсутствии информации о таких ведущих факторах риска РМЖ, как факторы репродуктивного поведения, невозможно обоснованно предполагать влияние профессионального воздействия ионизирующего излучения в изучаемой группе [14].

В США проведено исследование национального масштаба. Когорта из 90 957 медицинских техников, ответивших в период с 1994 по 1998 г. на вопрос о том, принимали ли они когда-либо участие в проведении интервенционных вмешательств под лучевым контролем, была прослежена в течение 2003–2005 гг. (заболеваемость) и до 31 декабря 2008 г. (смертность).

Онкологический риск среди техников, проводивших такие процедуры, рассчитывался по сравнению с техниками, никогда не принимавшими в них участие. В опытной группе зафиксирована значимо повышенная заболеваемость РМЖ (1,16; 95 % ДИ 1,02–1,32) и смертность от ЗН головного мозга (2,55; 95 % ДИ 1,48–4,40) и меланомы (1,30; 95 % ДИ 1,05–1,61). Несмотря на то, что повышение риска может быть следствием воздействия лучевого фактора в низких дозах, авторы осторожны в выводах и не исключают дополнительное влияние неучтенных мешающих факторов нерадиационной природы [24].

Еще в одном из недавно представленных исследований, также проведенном в США, прослежена (1979–2008 гг.) смертность в 2 когортах врачей: психиатров ($n = 64\,401$) и врачей, возможно проводивших интервенционные процедуры под лучевым контролем ($n = 45\,634$). Общая и онкологическая смертность была статистически значимо ниже во 2-й когорте. Смертность в ней от ЗН отдельных локализаций также не превышала таковую в когорте психиатров. Отмечая недостатки исследования, его авторы заключают, что данные требуют подтверждения в больших когортных исследованиях с определением индивидуальных доз, описанием всего профессионального маршрута врачей и длительностью прослеживания, существенно превышающей средний возраст жизни [25].

Формирование когорт медицинских работников, подвергавшихся воздействию лучевого фактора, проводилось по принципу альтернативности экспозиции (да/нет), в то время как, по разным данным, действующая на врача эффективная доза на одно интервенционное вмешательство варьирует более чем на порядок: от 0,5–1,0 до 10–15 мЗв/г в зависимости от количества выполняемых интервенционных процедур, их типов, продолжительности и режимов рентгеноскопии и т. д. В Нормах радиационной безопасности 99/2009 (НРБ-99/2009, Санитарно-эпидемиологические правила и нормы 2.6.1.2523–09) установлены основные пределы доз профессионального облучения персонала, непосредственно работающего с источниками ионизирующего излучения: по эффективной дозе – 20 мЗв/г в среднем за любые последовательные 5 лет, но не более 50 мЗв/г [26].

Указанные дозы относятся лишь к группе А, т. е. к рентгенологам и рентгенолаборантам. В современных интервенционных процедурах принимают участие и другие специалисты (хирурги, кардиологи, гастроэнтерологи, анестезиологи, технический персонал), которые формально относятся к персоналу группы Б, к находящемуся по условиям работы в сфере воздействия ионизирующего излучения, но непосредственно не работающим с его источниками. Однако среди различных групп медицинских специалистов, принимающих участие в проведении операции (хирурги, рентгенологи, анестезиологи, медицинские сестры и др.), наибольшие дозы облучения получают врачи-хирурги

и их ассистенты. Например, эффективная доза, получаемая хирургом при проведении операции на кровеносных сосудах, составляет 2,58–3,60 мкЗв, а рентгенолога, обеспечивающего рентгенологическое сопровождение операции, – 0,008–0,018 мкЗв [27].

Для группы Б в НРБ-99/2009 установлены пределы дозы в 4 раза ниже, чем приведенные выше нормативы для группы А. Несмотря на то, что реальное радиационное воздействие на организм практически одинаково для обеих групп или даже может быть выше для группы Б, на них не распространяются льготы, предоставляемые сотрудникам группы А в связи с вредными условиями труда. Очевидно, данная проблема может быть решена на основе официального включения указанных специалистов в группу А, для чего необходимо внести изменения в соответствующие нормативные документы. Таким образом, наряду с дозиметрическим контролем, техническими, административными мерами, направленными на профилактику вредного воздействия ионизирующего излучения на медицинский персонал, необходимо совершенствование нормативной базы, как основы социальной защиты экспонированных лиц [26].

Помимо ионизирующего излучения на медицинский персонал действуют факторы неионизирующей природы, формирующиеся при проведении рентгенодиагностических и рентгенохирургических процедур. К ним относятся неблагоприятные показатели аэрионного состава воздуха, дисбаланс температуры и влажности, электростатические и электромагнитные поля различных частотных диапазонов, создаваемые работой видеотерминалов, силовых кабелей и прочей электроаппаратуры. В совокупности они могут усиливать неблагоприятный эффект воздействующего ионизирующего излучения [28].

Общий вывод большинства работ, посвященных этой проблеме, сводится к необходимости сбора корректной информации о воздействующих дозах на медицинский и технический персонал, выполняющий интервенционные вмешательства под лучевым контролем, и проведению длительного прослеживания этих производственных контингентов с оценкой онкологического риска. В целом это поможет оптимизировать стандартные протоколы радиологических процедур, определить адекватность применяемых в настоящее время защитных мер, обеспечить рекомендациями по скринингу ЗН и дать ценный материал для анализа онкологического риска, связанного с хронической лучевой экспозицией [29].

Обращение с канцерогенными химиопрепаратами

В результате увеличения онкологической заболеваемости и расширения сфер применения цитостатиков в различных областях медицины растет численность профессиональных контингентов, экспонированных к их действию. По косвенным оценкам сотни тысяч работников в нашей стране могут иметь контакт

с противоопухолевыми препаратами на рабочем месте. Различные аспекты неблагоприятного воздействия обращения с химиопрепаратами на медицинский персонал подробно освещены нами в отдельном обзоре [30]. В настоящей статье целесообразно привести основные выводы, вытекающие из представленного в нем анализа данных:

- загрязнение цитостатиками отмечается по всей цепочке внутрибольничной системы, а наиболее высокие уровни загрязнения обнаружены в аптечных помещениях, местах хранения препаратов и сбора отходов;
- цитостатики обнаруживаются в моче не только медицинского персонала, но и лиц, непосредственно не занятых введением препаратов; показано, что применение закрытых систем транспортировки химиопрепаратов внутри больничной сети снижает уровень их содержания в моче персонала;
- уровень генотоксического повреждения в среднем на 30 % выше у медицинского персонала, работающего с цитостатиками; значительно повышен уровень окислительного стресса;
- у женщин, работающих с химиопрепаратами, повышен на 46 % риск спонтанных аборт, а также риск врожденных пороков развития у детей;
- у работниц с профессиональной экспозицией к цитостатикам повышен риск развития РМЖ;
- в рекомендациях Европейской комиссии от 2016 г. профилактика возможных рисков при работе с цитостатиками определена как долгосрочная стратегия, обеспечивающая устойчивость и гибкость охранительной системы Европейского Союза.

В отношении научного обоснования мер профилактики в нашей стране складывается критическая ситуация: отсутствуют отечественные работы по оценке экспозиции к цитостатикам и риска ее неблагоприятных последствий для медицинского персонала. Оценки, полученные в других странах, неправомерно проецировать на производственные условия, имеющие место в отечественных онкологических учреждениях. Необходимо иметь собственные данные мониторинга производственной среды, оценки риска нарушения здоровья для различных профессиональных групп и производственных условий в целях разработки и внедрения адекватных мер профилактики.

Канцерогенные биологические факторы

Наряду с химическими канцерогенными веществами, которые могут присутствовать в рабочей зоне лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждений, возможен контакт медицинского и научного персонала с канцерогенными биологическими факторами, а именно с вирусами гепатита В и С, ВИЧ и др.

По оценке Всемирной организации здравоохранения, в Европе каждому воздействию с риском инфекции гепатита В каждый год подвергаются 304 тыс. медицинских работников, инфекции гепатита С — 149 тыс.,

ВИЧ-инфекции — 22 тыс. Вероятность инфицирования при профессиональном контакте с ВИЧ-инфекцией может составлять <0,3–4,4 %, с инфекцией гепатита С — 0,5–39,0 %, с инфекцией гепатита В — 18–37 % [31]. По данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии, в 2008 г. в России доля вирусного гепатита профессиональной этиологии составила 8,26 % (в 2007 г. — 10,95 %) среди профессиональных заболеваний, вызванных биологическим фактором. В основном он регистрируется в учреждениях здравоохранения и социального сектора: в 2012 г. — 100 %, в 2013 г. — 96,87 %. Из 12 случаев вирусного гепатита, зарегистрированных в 2013 г. в России, в 5 случаях были инфицированы врачи, в 3 — медицинские сестры [32].

Заражение гемотрансмиссивными инфекциями связано с производственными травмами, ведущими к нарушению кожных покровов: уколами иглами, порезами инфицированным медицинским инструментарием. По риску заражения в порядке его убывания можно выделить 3 группы медицинских работников: персонал в отделениях гемодиализа и гематологических; персонал лабораторных, реанимационных и хирургических отделений; сотрудники терапевтических отделений [33]. Наиболее высокий риск инфицирования ВИЧ отмечается при глубоких поражениях кожных покровов, подвергшихся воздействию видимой крови на медицинском инструментарии, и при травматическом соприкосновении с инструментом, находившимся в вене или артерии пациента. При поверхностных повреждениях кожи риск инфицирования составляет 0,1 % и менее в зависимости от объема крови и титра ВИЧ (вирусной нагрузки).

В России отмечается тенденция нарастания числа аварийных ситуаций, чреватых заражением трансмиссивными инфекциями. Так, по данным Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, анализ 692 учетных форм из 11 субъектов России показал, что в 2010–2011 гг. по сравнению с более ранним периодом (2006–2009 гг.) в 1,5 раза увеличился травматизм при хирургических операциях (с 22,2 до 32,7 %), отмечен рост аварийных ситуаций при проведении внутривенных инъекций. Можно ожидать, что тенденция увеличения частоты аварийных ситуаций сохранится с учетом активного роста числа ВИЧ-инфицированных лиц в последнее время. В сообщенных за 2010–2011 гг. случаях все пострадавшие медицинские работники нуждались в химиопрофилактике. Однако она была проведена в среднем только в 76 % случаев, редко использовались 3 антиретровирусных препарата (в 2010 г. — 46 %, в 2011 г. — 34 % всех случаев химиопрофилактики) [34]. Возникающие аварийные ситуации говорят о необходимости их тщательного анализа в целях выявления обстоятельств, при которых нарушаются правила техники безопасности и, возможно, некоторая коррекция этих правил. Строгое следование требованиям законодательных и нормативных актов, организация работы и профессиональный подход

при проведении процедур, сопряженных с опасностью гемоконтактного инфицирования, определяют эффективность профилактики заражения. Для ее повышения особую актуальность приобретают обучение персонала неукоснительному соблюдению правил техники безопасности, использование безопасного инструментария, барьерных средств защиты, расширение доступа медицинских работников к современным схемам химиопрофилактики [35–37].

Ночные смены

Больные, находящиеся на стационарном лечении, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии, нуждаются в круглосуточном контроле состояния здоровья. Медицинские работники, занятые их лечением и обслуживанием, работают по графику, включающему ночные смены. Работа в ночную смену связана с нарушением циркадных ритмов, т. е. ритмов физиологических функций организма в течение суток, и со снижением уровня мелатонина – гормона шишковидной железы, который вырабатывается в организме во время сна в ночное время. Он регулирует многие процессы в организме, в том числе выработку эстрогенов, а будучи естественным антиоксидантом, обладает антипролиферативным эффектом и препятствует развитию ЗН. Изменение циркадных ритмов приводит к изменению эстрогенной цикличности и гормональной секреции, что ведет к нарушению репродуктивной функции, гиперпластическим процессам в молочной железе и матке, повышенному риску развития РМЖ у женщин [38–41].

По оценкам, по сменному графику работает треть медицинского персонала, подавляющее большинство которого составляют медицинские сестры. Масштабные проспективные когортные исследования влияния сменного графика с наличием ночных смен на онкологический риск у медицинских сестер проведены в США в рамках проекта «Изучение здоровья медицинских сестер» (Nurses' Health Study: NHS и NHS II). Первое исследование (NHS) началось в 1976 г. и включало 121 701 медицинскую сестру в возрасте 30–55 лет. Члены когорты, проживавшие в 11 штатах, заполнили анкеты о состоянии здоровья, медицинском анамнезе, известных и возможных факторах онкологического риска. Данные о занятости в ночных сменах были получены в 1988 г. Из общего числа включенных в исследование сменную работу с наличием ночных смен указали в анкетах 78 562 медицинские сестры. В течение последующего прослеживания (1988–1998 гг.) в этой группе диагностирован 2441 случай РМЖ. Относительный риск развития РМЖ, связанный со сменной работой, был рассчитан на основании сравнения с медицинскими сестрами, которые никогда не работали по сменному графику. При контроле широкого диапазона известных факторов риска этой локализации риск РМЖ был рассчитан для групп со стажем 1–14, 15–29, ≥ 30 лет сменной работы. Статистически значи-

мо он оказался повышен только в группе ≥ 30 лет стажа (ОР 1,3; 95 % ДИ 1,04–1,78). Риск нарастал с увеличением стажа работы ($p_{\text{тренд}} = 0,02$) [42]. У медицинских сестер со стажем сменной работы ≥ 15 лет статистически значимо был повышен риск колоректального рака (ОР 1,35; 95 % ДИ 1,03–1,77) с нарастанием риска в зависимости от длительности стажа работы ($p_{\text{тренд}} = 0,04$) [43].

Второе исследование (NHS II), не перекрывавшее первое (NHS), было начато теми же авторами в 1989 г. и включало 116 087 медицинских сестер в возрасте 25–42 лет из 14 штатов. Когорта прослежена в течение более 12 лет (1989–2001 гг.). Риск РМЖ в группах со стажем сменной работы 1–9, 10–19, ≥ 20 лет был значимо повышен только в последней группе (ОР 1,78; 95 % ДИ 1,06–3,01) при отсутствии значимости его тренда ($p_{\text{тренд}} = 0,65$) [44].

В рамках того же проекта изучен риск развития рака эндометрия в связи с ночными сменами. Когорта из 53 487 медицинских сестер прослежена в течение 1988–2004 гг. Статистически значимое повышение риска рака эндометрия наблюдалось в группе со стажем сменной работы ≥ 20 лет (ОР 1,47; 95 % ДИ 1,03–2,10) при значимости тренда увеличения риска с ростом стажа работы ($p_{\text{тренд}} = 0,04$). Среди них риск был существенно выше в подгруппе медицинских сестер с индексом массы тела более 30 кг/м^2 – 2,09 (95 % ДИ 1,24–3,52). Тренд повышения риска с длительностью стажа сменной работы в этой группе также был более выражен ($p_{\text{тренд}} = 0,003$). В группе медицинских сестер с индексом массы тела менее 30 кг/м^2 статистически значимого повышения риска рака эндометрия не наблюдалось [45].

По оценке экспертов Международного агентства по изучению рака, совокупность эпидемиологических и экспериментальных доказательств позволила отнести сменную работу с нарушением циркадных ритмов к вероятным канцерогенным факторам для человека (группа 2А) [46]. Исследование канцерогенной опасности этого фактора продолжается, и недавно был проведен анализ объединенных данных 5 исследований случай – контроль, выполненных в Австралии, Канаде, Германии, Франции и Испании: 6093 случая РМЖ и 6933 здоровых женщины (контроль). Выявлено влияние занятости в ночных сменах на риск РМЖ у женщин, находящихся в периоде менопаузы, который нарастал с длительностью стажа работы по сменному графику и частотой ночных смен в неделю. У женщин в периоде постменопаузы такой связи не наблюдалось [47].

Работа в ночную смену вызывает широкий спектр нарушений здоровья женщин: повышается риск миомы матки, мастопатии, эндометриоза, выкидышей, ожирения, гипертонической болезни, расстройства сна неорганической этиологии, хронической усталости. Компенсаторные резервы организма не безграничны. При постоянном давлении комплекса психосоциальных и производственных факторов наступает дезадаптация

и поломка защитных механизмов организма. В случае воздействия работы в ночную смену наиболее уязвимой, по-видимому, является репродуктивная система женщин. Согласно отечественным нормативным документам занятость в ночных сменах, ведущая к развитию психоэмоционального стресса, относится к числу производственных факторов, опасных для репродуктивного здоровья женщины. В этом контексте нарушения менструальной функции, привычный выкидыш, бесплодие у женщин, подвергающихся чрезмерным сенсорно-эмоциональным нагрузкам при работе в ночные смены, рассматриваются как профессионально обусловленные [48]. Существует прецедент отнесения случаев РМЖ к профессиональным заболеваниям с соответствующей компенсацией ущерба здоровью. Так, в Дании, например, были признаны профессиональными 38 случаев РМЖ у женщин, проработавших не менее 20 лет на работах с ночными сменами и не имевших других факторов риска (употребление алкоголя, РМЖ у близких родственников) [49].

Занятость в ночных сменах отрицательно влияет на качество жизни медицинских работников, вызывает неудовлетворенность работой, желание ее оставить, что в целом определяет не только медицинский, но и социальный аспекты ее последствий [50–52]. Для разработки адекватных мер профилактики необходимо продолжение изучения контингентов с различными графиками сменной работы в конкретных производственных условиях. Вместе с тем уже имеющиеся данные о широком спектре негативных эффектов на здоровье работы в ночную смену (особенно женщин) и связанным с ними ухудшении качества жизни говорят о необходимости внедрения в практику мероприятий по их профилактике.

Психоэмоциональное напряжение

На здоровье медицинских работников наряду с комплексом гигиенических (физических, химических, биологических) факторов рабочей среды существенное влияние могут оказывать груз персональной и социальной ответственности, а также напряженность работы, обусловленная высокими психоэмоциональными и физическими нагрузками. Развивающийся вследствие этого синдром хронической усталости смыкается с синдромом эмоционального выгорания (СЭВ), вероятность формирования которого особенно высока у медицинских работников и последствия которого отрицательно сказываются не только на их здоровье, но и на выполнении профессиональных обязанностей [53, 54]. В Международной классификации болезней 10-го пересмотра СЭВ отнесен к рубрике Z73 – «Стресс, связанный с трудностью поддержания нормального образа жизни».

Многочисленные публикации, наличие программ и проведение конференций, посвященных здоровью врачей в США, Канаде, Европе и странах Тихоокеанского региона, свидетельствуют об актуальности этой

проблемы. Специфика работы с повышенным уровнем психоэмоционального напряжения нередко ведет к эмоциональному истощению, бессоннице и депрессии. Именно такого рода симптоматика превалирует среди врачей [55]. У медицинских сестер стресс на рабочем месте и неудовлетворенность работой обнаруживают свое влияние на здоровье уже на ранних стадиях его нарушения, выражаясь в изменении биохимических и иммунологических показателей, что ведет к снижению защитных функций организма [56].

Как отмечают отечественные авторы, в наших условиях, помимо указанных факторов, стресс может усугубляться несоответствующей организацией рабочего места, нерациональной тратой рабочего времени, недостаточной материально-технической базой, необходимой для качественного лечения пациентов, невысоким качеством жизни врачей (низкая оплата труда, неудовлетворительные жилищные условия и др.) [57].

Условия работы и возможный стресс, связанный с ними, несомненно следует рассматривать как важную составляющую удовлетворенности жизнью. Этот аспект специально изучался в исследовании, проведенном в Германии. В рамках Европейского проспективного изучения риска рака в связи с питанием (EPIC) оценивалось влияние удовлетворенности жизнью на риск развития ЗН, сердечно-сосудистых заболеваний и диабета 2-го типа при стандартизации по установленным факторам риска. В среднем в течение 8 лет прослежены 50 358 лиц с базовой оценкой удовлетворенности жизнью, полученной методом опроса в начале прослеживания. У женщин, не удовлетворенных жизнью на тот момент, выявлен статистически значимо повышенный риск ЗН (1,45; 95 % ДИ 1,18–1,78), инсульта (1,69; 95 % ДИ 1,05–2,73), а также диабета 2-го типа по сравнению с женщинами, удовлетворенными жизнью. У мужчин значимой связи этого фактора с изучаемыми хроническими заболеваниями не наблюдалось [58].

Метаанализ 12 Европейских когортных исследований включал 116 056 мужчин и женщин. На момент начала исследования они не страдали онкологическим заболеванием и имели (по опросу) разный уровень профессионального стресса. В соответствии с его базовым уровнем весь контингент был разделен на 4 группы: от самого высокого до низкого. В течение прослеживания (в среднем 12 лет) у 5765 лиц были диагностированы ЗН. Сравнение групп с самым высоким и самым низким уровнями профессионального стресса с использованием мультивариантного анализа при стандартизации по мешающим факторам не выявило его значимого влияния на общий онкологический риск (ОР 0,97; 95 % ДИ 0,90–1,04). Аналогично не наблюдалось связи стресса на работе с риском колоректального рака, РМЖ, рака легкого и предстательной железы. Тем не менее авторы не исключают возможного влияния стресса на риск развития других локализаций ЗН [59].

Особый интерес представляет изучение влияния этого фактора на онкологический риск у медицинских работников. При прослеживании в течение 8 лет 37 562 медицинских сестер в США с разными уровнями профессионального стресса не выявлено его влияния на риск развития РМЖ: при всех уровнях он был практически одинаков и понижен [60].

Вместе с тем повышенный по сравнению с популяцией риск смерти медицинских работников от суицидов, особенно женщин, отмеченный в эпидемиологических работах, может свидетельствовать о стрессовых ситуациях, связанных с профессией. По результатам метаанализа 25 исследований, выполненных в 1966–2003 гг. в разных странах, риск суицидов у врачей-мужчин составил 1,41 (95 % ДИ 1,21–1,65), у женщин – 2,27 (95 % ДИ 1,90–2,73) [61]. Повышенную смертность от суицидов анестезиологов связывают с воздействием комплекса вредных производственных факторов: ионизирующим излучением, канцерогенными веществами, аварийными ситуациями при кожных проколах иглами, психоэмоциональным напряжением [62]. При сравнении когорт интернов ($n = 40\ 211$) и анестезиологов ($n = 40\ 242$), сопоставимых по полу, десятилетию рождения, гражданству США, у анестезиологов при отсутствии различий смертности от всех причин и ЗН, помимо значимо повышенной смертности от суицидов (ОР 1,45; 95 % ДИ 1,07–1,97), выявлена повышенная смертность от злоупотребления наркотическими средствами, внешних причин, ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита [63]. По опросу, проведенному среди американских хирургов, 1 из 16 отметил у себя наличие суицидальных намерений в течение 12 мес, предшествующих опросу. Их частота среди хирургов в 1,5–3,0 раза превышала таковую в общей популяции ($p < 0,02$). При контроле персональных и профессиональных характеристик выявлена сильная связь суицидальных намерений с СЭВ и депрессией ($p < 0,001$). Только 26 % из них обратились за психологической или психиатрической помощью, в то время как 60 % не пожелали этого делать из-за боязни отрицательного влияния такого обращения на их карьеру [64]. Еще в одной обязательной профессиональной группе в производственном контингенте крупных медицинских учреждений – патологоанатомов – была выявлена статистически значимо повышенная смертность от суицидов. У британских патологоанатомов-мужчин она в 3,53 раза (95 % ДИ 1,66–6,62) превышала популяционный уровень, а у женщин этой профессиональной группы – в 10,15 раза (95 % ДИ 1,80–31,96) [65].

Имеющиеся данные дают основание полагать, что комплекс воздействующих на медицинский персонал профессиональных факторов приводит к развитию состояния, выход из которого может принять фатальный характер. Результаты многочисленных исследований не дают однозначного ответа на вопрос о наличии причинно-следственной связи стресса на работе с онкологическим риском, так как трудно разделить

влияние стресса, психических, эмоциональных, поведенческих факторов, которые нередко связаны друг с другом. Кроме того, противоречивость результатов может быть обусловлена методологическими погрешностями исследований: систематическими ошибками, отсутствием учета мешающих факторов, малочисленностью исследованных контингентов, коротким периодом наблюдения и др. Поэтому многие авторы сходятся во мнении о необходимости дальнейшего изучения всего диапазона психоэмоциональных и психосоциальных факторов в контексте их влияния на онкологический риск у медицинских работников в корректных эпидемиологических исследованиях [66–68]. По-видимому, эффективность профилактики профессионального стресса у медицинских работников определяется сочетанием действий, направленных на устранение производственных причин возникновения стресса и персонифицированную работу с медицинским персоналом.

Психоэмоциональные нагрузки, сами по себе не являющиеся доказанным фактором онкологического риска, ведут к образу жизни, в котором присутствует курение, тяга к употреблению алкоголя, несбалансированное питание и, как следствие, тучность, малоподвижный образ жизни, т. е. факторы, этиологически значимые в развитии ЗН.

Влияние курения на онкологический риск у врачей изучено английскими эпидемиологами R. Doll и R. Peto. В исследовании, ставшем классическим, 20 540 мужчин-врачей в возрасте 35 лет и старше, ответивших на анкету в ноябре 1951 г., были прослежены до 1 ноября 1971 г. В среднем врачи общей практики курили на 37 % больше сигарет, чем госпитальные врачи и хирурги, и их общая смертность на 23 % была выше таковой среди госпитального персонала того же возраста. В основном это объяснялось повышенной смертностью от заболеваний, связанных с курением (рак легкого, хронический бронхит, ишемическая болезнь сердца, сердечно-легочная недостаточность) [69]. В последующие 30 лет наблюдалась устойчивая тенденция к снижению распространенности курения среди врачей в развитых странах. Самые низкие показатели отмечены в США, Австралии и Великобритании (<10 %), высокие – в Италии и Франции (>20 %), Китае (45 %), Японии (43 %), Греции (49 %) [70].

По отечественным данным, врачи нередко выбирают курение как средство успокоения. Согласно социологическим опросам распространенность курения среди врачей в регионах России составляет 34–43 % (постоянно курящих 21 %), среди среднего медицинского персонала – 16–29 % (постоянно курящих 9 %) [71]. Многие из них курят со студенческой скамьи [72]. В г. Москве в 2005–2006 гг., согласно опросу 637 врачей, курили 35,1 % мужчин и 15,7 % женщин [73]. Опрос, проведенный позднее ГНИЦ профилактической медицины в 2013–2015 гг., показал распространенность курения среди врачей в России, в среднем равную 17 %.

В г. Москве доля курящих врачей выше, чем в других городах, – 29 %. Приведенные данные свидетельствуют о том, что распространенность курения среди медицинских работников в России не снижается. О своем питании заботятся около 83 % участников опроса, а 17 % не предпринимают в этом направлении никаких усилий. Примерно половина опрошенных (46 %) заявили, что имеют проблемы с избыточной массой тела, а 49 % считают свою массу тела оптимальной. Среди российских врачей не употребляют алкоголь лишь 10–12 %, страдают алкоголизмом 5–7 %. Таким образом, врачи, хорошо информированные о роли здорового образа жизни в профилактике ЗН, в большом проценте случаев не придерживаются его [74, 75].

Для врачей характерны самолечение, работа при наличии симптомов заболевания, более редкое использование больничных листов по сравнению с общим работающим населением, что приводит в конечном итоге к хроническим заболеваниям. С другой стороны, замечено, что врачи – сложившиеся специалисты – нередко откладывают обращение за квалифицированной медицинской помощью до тех пор, пока не становится очевидной острая необходимость такой помощи [76, 77]. В России медицинские работники являются контингентом с обязательным прохождением периодических медицинских осмотров, в ходе которых им доступна высококвалифицированная медицинская помощь. Однако из многочисленных опросов работников отечественных учреждений здравоохранения следует, что в подавляющем большинстве случаев проведение периодических медицинских осмотров носит формальный характер.

Заключение

Приведенные выше эпидемиологические данные, безусловно, не исчерпывают всего многообразия отрицательных последствий для здоровья медицинских работников действия профессиональных факторов, каждый из которых заслуживает отдельного рассмотрения. Существующие руководства, регламентирующие характер профессионального поведения в условиях воздействия перечисленных производственных факторов, не всегда достигают своей цели, что наиболее наглядно иллюстрируют аварийные ситуации с заражением гемоконтактными инфекциями.

Принимая во внимание весь спектр неблагоприятных производственных воздействий, влияющих

на состояние здоровья медицинских работников, нельзя исключить недоучет случаев профессионального рака в этой группе. По нашим данным, в материалах Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора по профессиональной заболеваемости в России за 2002–2014 гг. зафиксировано всего 3 случая профессионального ЗН у медицинских работников из 497 случаев, зарегистрированных за этот период. Возможный недоучет случаев профессионального рака (3 случая за 13 лет на всю страну!) практически не влияет на страховые выплаты и не побуждает администрацию лечебных учреждений принимать эффективные меры к снижению возможной канцерогенной опасности на рабочих местах. Профессиональное заболевание, в частности профессиональный рак, устанавливается на основе медико-социальной экспертизы и влечет за собой определенные компенсационные выплаты. Его недоучет ведет к ущемлению интересов заболевших лиц и их семей, т. е. к снижению их социальной защищенности.

К сожалению, приходится констатировать наличие лишь единичных отечественных эпидемиологических работ, посвященных онкологическому аспекту влияния профессиональных факторов на медицинских работников. Необходимость таких исследований чрезвычайно актуальна с учетом расширения сферы применения в медицинской практике канцерогенных химиопрепаратов, лучевых методов диагностики и лечения, что, в свою очередь, влечет за собой увеличение экспонированных к ним контингентов медицинских работников. Назрела необходимость включения медицинских учреждений в процесс паспортизации канцерогеноопасных организаций, ведущийся в стране и направленный на оценку численности контингентов, подвергающихся воздействию канцерогенных агентов на рабочем месте. Мониторинг канцерогенных факторов рабочей среды, донозологических проявлений их воздействия и онкологических заболеваний в профессиональных группах медицинских работников с использованием современных эпидемиологических подходов позволит разрабатывать адекватные меры профилактики, учитывающие многофакторность этиологии ЗН. В целом эти меры дадут представление об истинном положении дел в нашей стране и позволят правильно расставить приоритеты в профилактике рака у медицинских работников.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Росстат: онлайн сборник «Россия в цифрах». 2017. С. 148. [Rosstat: online collection "Russia in numbers". 2017. P. 148. (In Russ.)].
2. Frank E., Biola H., Burnett C.A. Mortality rates and causes among U. S. physicians. *Am J Prev Med* 2000;19(3):155–9. PMID: 11020591.
3. Carpenter L.M., Swerdlow A.J., Fear N.T. Mortality of doctors in different specialties: findings from a cohort of 20000 NHS hospital consultants. *Occup Environ Med* 1997;54(6):388–95. PMID: 9245944.
4. Aasland O.G., Hem E., Haldorsen T., Elseberg O. Mortality among Norwegian doctors 1960–2000. *BMC Public Health* 2011;11:173. DOI: 10.1186/1471-2458-11-173. PMID: 21426552. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/173>.
5. Innos R., Rahu K., Baburin A., Rahu M. Cancer incidence and cause-specific mortality in male and female physicians: a cohort study in Estonia. *Scand J Public Health* 2000;30(2):133–40. DOI: 10.1080/14034940210133735. PMID: 12028862.
6. Liu S.H., Liu Y.F., Lin Y.L. et al. Mortality and cancer incidence among physicians of traditional Chinese medicine: a 20-year national follow-up study. *Occup Environ Med* 2010;67(3):166–9. DOI: 10.1136/oem.2009.050021. PMID: 20223844.
7. Pukkala E., Martinsen J.I., Lynge E. et al. Occupation and cancer – follow-up of 15 million people in five Nordic countries. *Acta Oncol* 2009;48(5):646–790. DOI: 10.1080/02841860902913546. PMID: 19925375.
8. Shen C.C., Hu Y.W., Hu L.Y. et al. The risk of cancer among Taiwanese female registered nurses: a nationwide retrospective study. *PLoS One* 2013;8(7):e68420. DOI: 10.1371/journal.pone.0068420. PMID: 23874621.
9. Klein-Kremer A., Liphshitz I., Haklal Z. et al. Cancer incidence among physicians in Israel. *Isr Med Assoc J* 2014;16(7):412–7. PMID: 25167685.
10. Maitre A., Colonna M., Gressin C. et al. Increased incidence of haematological cancer among physicians in a University Hospital. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;76(1):24–6. DOI: 10.1007/s00420-002-0378-5. PMID: 12592579.
11. Petralia S.A., Dosemeci M., Adams E.E., Zahm S.H. Cancer mortality among women employed in health care occupations in 24 U. S. states, 1984–1993. *Am J Ind Med* 1999;36(1):159–65. PMID: 10361602.
12. King A.S., Threlfall W.J., Band P.R., Gallagher R.P. Mortality among registered nurses and school teachers in British Columbia. *Am J Ind Med* 2007;26(1):125–32. PMID: 8074120.
13. Бульбулян М.А. Профессия и рак молочной железы. Вестник Российской академии медицинских наук 1996;(3):19–20. [Bul'bulyan M.A. Occupation and breast cancer in females. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 1996;(3):19–20. (In Russ.)].
14. Соленова Л.Г. Производственные факторы и онкологический риск у онкологов. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2009;20(2):41–7. [Solenoval L.G. Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin of N.N. Blokhin RCRC 2009;20(2):41–7. (In Russ.)].
15. Thomas T.L., Waxweiler R.J. Brain tumors and occupational risk factors: a review. *Scand J Work Environ Health* 1986;12:1–15.
16. Demetris P.A., Vaughan T.L., Schommer R.R. Occupation, socioeconomic status, and brain tumor mortality: a death certificate-based case-control study. *J Occup Med* 1991;33(9):1001–6. PMID: 1660541.
17. Carozza S.E., Wrensch M., Miike R. et al. Occupation and adult gliomas. *Am J Epidemiol* 2000;152:838–46.
18. Wakeford R. Radiation in the workplace – a review of studies of the risks of occupational exposure to ionizing radiation. *J Radiol Prot* 2009;29(2A):A61–79. DOI: 10.1088/0952-4746/29/2A/S05. PMID: 19454806.
19. Smith P.G., Doll R. Mortality from cancer and all causes among British radiologists. *Br J Radiol* 1981;54(639):187–94. DOI: 10.1259/0007-1285-54-639-187. PMID: 7470779.
20. Линденбратен Л.Д. Лучевая диагностика: достижения и проблемы нового времени. Радиология – Практика 2007;(3):4–13. [Lindenbraten L.D. Radiological diagnoses: new time success and problems. *Radiologiya – Praktika = Radiology-Practice* 2007;(3):4–13. (In Russ.)].
21. Rogium A., Goldstein J., Bar O., Goldstein J.A. Brain and neck tumors physicians performing interventional procedures. *Am J Cardiol* 2013;111:1368–72. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.12.060. PMID: 23419190.
22. Lie J.A., Kjaerheim K., Tynes T. Ionizing radiation exposure and cancer risk among Norwegian nurses. *Eur J Cancer Prev* 2008;17(4):369–75. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e3282b6fe0a. PMID: 18562964.
23. Jartti P., Pukkala E., Utti J., Auvinen A. Cancer incidence among physicians occupationally exposed to ionizing radiation in Finland. *Scand J Work Environ Health* 2006;32(5):368–73. PMID: 17091204.
24. Rajaraman P., Doody M.M., Yu C.L. et al. Cancer risks in U. S. radiologic technologists working with fluoroscopically guided interventional procedures, 1994–2008. *Am J Roentgenol* 2016;200(5):1101–8. DOI: 10.2214/AJR.15.15265. PMID: 26998721.
25. Linet M.S., Kitahara C.M., Ntowe E. et al. Mortality in U. S. physicians likely to perform fluoroscopy-guided interventional procedures compared with psychiatrists, 1979 to 2008. *Radiology* 2017;284(2):482–94. DOI: 10.1148/radiol.2017161306. PMID: 28234559.
26. Котенко К.В., Бушманов А.Ю., Тюрин И.Е. и др. К вопросу о вредных условиях труда в радиологических подразделениях медицинских учреждений. Медицинская физика 2013;(2):90–6. [Kotenko K.V., Bushmanov A.Yu., Tyurin I.E. et al. To the question about unhealthy trade in radiology departments of medical establishments. *Meditsinskaya fizika = Medical Physics* 2013;(2):90–6. (In Russ.)].
27. Мавренков Э.М. Радиационно-гигиеническая характеристика доз облучения медицинского персонала и пациентов при интервенционных методах диагностики и лечения в лечебно-профилактических учреждениях Министрства обороны Российской Федерации. Доступно по: <http://medical-diss.com/medicina/radiatsionno-gigienicheskaya-harakteristika-doz-oblucheniya-meditsinskogo-personala-i-patsientov-pri-interventsionnyh-met-1#ixzz5JcmUBYUh>. [Mavrenkov E.M. Radiologic and hygienic assessment of ionizing radiation doses for medical personnel and patients under interventional procedures in hospitals of Defense ministry of Russian Federation. Available at: <http://medical-diss.com/medicina/radiatsionno-gigienicheskaya-harakteristika-doz-oblucheniya-meditsinskogo-personala-i-patsientov-pri-interventsionnyh-met-1#ixzz5JcmUBYUh>. (In Russ.)].
28. Пальцева А.С. Изучение комплекса факторов нерадиационной природы в кабинетах рентгенодиагностики. Бюллетень Научного совета «Медико-экологические проблемы работающих» 2006;(3):54–6. [Pal'tzeva A.S. The study of complex of no X-ray factors in X-ray diagnostic rooms. *Byulleten' nauchnogo soveta "Medico-ecologicheskie problemy rabotavshchikh"* = Bulletin of the Scientific Council "Medico-ecological

- problems of workers” 2006;(3):54–6. (In Russ.).]
29. Linet M.S., Kim K.P., Miller D.L. et al. Historical review of occupational exposures and cancer risks in medical radiation workers. *Radiat Res* 2010;174(6):793–808. DOI: 10.1667/RR2014.1. PMID: 21128805.
 30. Соленова Л.Г., Якубовская М.Г. Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4(3):10–20. [Solenova L.G., Yakubovskaya M.G. Chemotherapy: some potential risks under antineoplastic drugs handling. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2017;4(3):10–20. (In Russ.).]
 31. Corrao C.R., Mazzotta A., La Torre G., De Giusti M. Biological risk and occupational health. *Ind Health* 2012;50(4):326–37. PMID: 22785422.
 32. О состоянии профессиональной заболеваемости в Российской Федерации в 2013 г. Информационный сборник статистических и аналитических материалов. М., 2014. 60 с. [On state of occupational incidence in Russian Federation in 2013. Information collection of statistical and analytical materials. M., 2014. 60 p. (In Russ.).]
 33. Профилактика инфекционных заболеваний медицинских работников. Доступно по: <http://medbe.ru/materials/profilaktika-infektsiy/zabolevaemost-meditinskikh-rabotnikov-infektsionnyimi-boleznyami-svyazannaya-s-professionalnoy-deyat/>. [Infectious disease prevention in health care workers. Available at: <http://medbe.ru/materials/profilaktika-infektsiy/zabolevaemost-meditinskikh-rabotnikov-infektsionnyimi-boleznyami-svyazannaya-s-professionalnoy-deyat/>. (In Russ.).]
 34. Нарсия Р.С., Козырина Н.В., Суворова З.К. и др. Мониторинг постконтактной профилактики профессионального заражения ВИЧ в лечебных учреждениях. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2012;(6):26–31. [Narsia R.S., Kosyrina N.V., Suvorova Z.K. et al. Monitoring of post contact prevention of occupational HIV infection in health care facilities. *Epidemiologia i infeksionnye bolezni* = *Epidemiology and Infectious Diseases* 2012;(6):26–31. (In Russ.).]
 35. Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ). [Federation law “On foundation of people health guarding in Russian Federation” (21 Nov. 2011 No 323 FL). (In Russ.).]
 36. СанПиН 2.1.3.2630–10. «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность». [SanPiN 2.1.3.2630–10. “Sanitary-epidemiological demands to facilities providing medical activity”. (In Russ.).]
 37. Применение безопасного медицинского оборудования, в том числе инъекционного с инженерной защитой от повторного использования. Доступно по: zdrav36.ru/doklad.docx. [Use of safe medical equipment including injectational one with engineering defense from repeated using. Available at: zdrav36.ru/doklad.docx. (In Russ.).]
 38. Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)* 2003;53(2):103–8. PMID: 12637594.
 39. Anisimov V.N. Light pollution, reproductive function and cancer risk. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27(1–2):35–52. PMID: 16648818.
 40. Schernhammer E.S., Vitonis A.F., Rich-Edwards J., Missmer S.A. Rotating nightshift work and the risk of endometriosis in premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205(5):476. e1–8. DOI: 10.1016/j.ajog.2011.06.002. PMID: 21907958.
 41. Mahoney M.M. Shift work, jet lag, and female reproduction. *Int J Endocrinol* 2010;2010:813764. PMID: PMC2834958 DOI: 10.1155/2010/813764. PMID: 20224815.
 42. Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E. et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses’ health study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(20):1563–8. DOI: 10.1093/jnci/93.20.1563. PMID: 11604480.
 43. Schernhammer E.S., Laden F., Speizer F.E. et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses’ health study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(11):825–8. PMID: 12783938.
 44. Schernhammer E.S., Kroenke C.H., Laden F., Hankinson S.E. Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology* 2006;17(1):108–11. PMID: 16357603.
 45. Viswanathan A.N., Hankinson S.E., Schernhammer E.S. Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer Res* 2007;67(21):10618–22. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2485. PMID: 17975006.
 46. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 98. Painting, Firefighting, and Shiftwork. IARC. Lyon. France. 2010.
 47. Cordina-Duverger E., Menegaux F., Popa A. et al. Night shift work and breast cancer: a pooled analysis of population-based case-control studies with complete work history. *Eur J Epidemiol* 2018;33(4): 369–79. DOI: 10.1007/s10654-018-0368-x. PMID: 29464445.
 48. Гигиеническая оценка вредных производственных факторов и производственных процессов, опасных для репродуктивного здоровья человека. Методические рекомендации № 11–8/240–09. М., 2002. [Hygienic assessment of harmful occupational factors dangerous for human reproduction. Guideline No 11–8/240–09. Moscow, 2002. (In Russ.).]
 49. Wise J. Danish night shift workers with breast cancer awarded compensation. *BMJ* 2009;338: b1152. PMID: 19297443.
 50. Smith-Coggins R., Broderick K.B., Marco C.A. Night shifts in emergency medicine: the American board of emergency medicine longitudinal study of emergency physicians. *J Emerg Med* 2014;47(3):372–8. DOI: 10.1016/j.jemermed.2014.04.020. PMID: 24881892.
 51. Dall’Ora C., Griffiths P., Ball J. et al. Association of 12 h shifts and nurses’ job satisfaction, burnout and intention to leave: findings from a cross-sectional study of 12 European countries. *BMJ Open* 2015;5(9):e008331. DOI: 10.1136/bmjopen-2015-008331. PMID: 26359284.
 52. Ball J., Day T., Murrells T. et al. Cross-sectional examination of the association between shift length and hospital nurses job satisfaction and nurse reported quality measures. *BMC Nurs* 2017;16:26. DOI: 10.1186/s12912-017-0221-7. PMID: 28559745.
 53. Балахонов А.В., Белов В.Г., Пятибрат Е.Д., Пятибрат А.О. Эмоциональное выгорание у медицинских работников как предпосылка астенизации и психосоматической патологии. *Вестник Санкт-Петербургского университета* 2009;11(3):57–71. [Balakhonov A.V., Belov V.G., Pyatibrat E.D., Pyatibrat A.O. Burnout in health care workers as precursor of asthenic and psychosomatic pathology. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta* = *Bulletin of Saint Petersburg University* 2009;11(3):57–71. (In Russ.).]
 54. Власова И.М., Ивашова Ю.А., Попонина Ю.Н., Кудлаев С.В. Оценка функционального состояния организмов стажированных медицинских работников. *Медицина труда и промышленная экология* 2016;(12):10–4. [Vlasova I.M., Ivashova Yu.A., Poponina Yu.N., Kudlaev S.V. Evaluation of functional state in medical personnel with long length of service. *Meditina truda i promyshlennaya ekologiya* = *Occupational Medicine and Industrial Ecology* 2016;(12):10–4. (In Russ.).]
 55. Tyssen R. Health problems and the use of health services among physicians: a review article with particular emphasis on Norwegian studies. *Ind Health* 2007;45(5):599–610. PMID: 18057803.
 56. Amati M., Tomasetti M., Ciuccarelli M. et al. Relationship of job satisfaction, psychological distress and stress-related biological parameters among healthy nurses: a longitudinal study. *J Occup Health* 2010;52(1):31–8. PMID: 20032591.

57. Федина Н.В. Проблема профессионального риска и качества жизни врачей. *Здравоохранение Российской Федерации* 2008;(6):27–30. [Fedina N.V. The problem of occupational risk and physician's life quality. *Zdravookhranenie Russiyskoy Federatsii = Health of the Russian Federation* 2008;(6):27–30. (In Russ.)].
58. Feller S., Teucher B., Kaaks R. et al. Life satisfaction and risk of chronic diseases in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) – Germany study. *PLoS One* 2013;8(8):e73462. DOI: 10.1371/journal.pone.0073462. PMID: 23977388.
59. Heikkilä K., Nyberg S.T., Theorell T. et al. Work stress and risk of cancer: meta-analysis of 5700 incident cancer events in 116 000 European men and women. *BMJ* 2013;346:f165. PMID: 23393080.
60. Schernhammer E.S., Hankinson S.E., Rosner B. et al. Job stress and breast cancer risk: the nurses' health study. *Am J Epidemiol* 2004;160(11):1079–86. DOI: 10.1093/aje/kwh327. PMID: 15561987.
61. Schernhammer E.S., Colditz G.A. Suicide rates among physicians: a quantitative and gender assessment (meta-analysis). *Am J Psychiatry* 2004;161(12):2295–302. DOI: 10.1176/appi.ajp.161.12.2295. PMID: 15569903.
62. Schoeffler P., Christian Duale C., Walder B. Risks of being an anaesthesiologist. *Eur J Anaesth* 2011;28(11):756–7. DOI: 10.1097/EJA.0b013e32834c7f7e. PMID: 21975654.
63. Alexander B.H., Checkoway H., Nagahama S.I., Domino K.B. Cause-specific mortality risks of anesthesiologists. *Anesthesiology* 2000;93(4):922–30. PMID: 11020740.
64. Shanafelt T.D., Balch C.M., Dyrbye L. et al. Special report: suicidal ideation among American surgeons. *Arch Surg* 2011;146(1):54–62. DOI: 10.1001/archsurg.2010.292. PMID: 21242446.
65. Harrington J.M., Oakes D. Mortality study of British pathologists 1974–80. *Br J Ind Med* 1984;41(2):188–91. PMID: 6722045.
66. Dalton S.O., Boesen E.H., Ross L. et al. Mind and cancer. Do psychological factors cause cancer? *Eur J Cancer* 2002;38(10):1313–23. PMID: 12091060.
67. Garssen B. Psychological factors and cancer development: evidence after 30 years of research. *Clin Psychol Rev* 2004;24(3):315–38. DOI: 10.1016/j.cpr.2004.01.002. PMID: 15245834.
68. Schraub S., Sancho-Garnier H., Velten M. Should psychological events be considered cancer risk factors? *Rev Epidemiol Sante Publique* 2009;57(2):113–23. DOI: 10.1016/j.respe.2008.12.012. PMID: 19345029.
69. Doll R., Peto R. Mortality among doctors in different occupations. *Br Med J* 1977;1(6074):1433–6. PMID: 861678.
70. Smith D.R., Leggat P.A. An international review of tobacco smoking in the medical profession: 1974–2004. *BMC Public Health* 2007;7:115. DOI: 10.1186/1471-2458-7-115. PMID: 17578582.
71. <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/7/115>.
72. Гурьянов М.С., Камаев И.А., Иванов А.А., Миронов С.В. Распространенность курения среди медицинских работников. Доступно по: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranennost-kureniya-sredi-meditsinskih-rabotnikov>. [Gur'yanov M.S., Kamaev I.A., Ivanov A.A., Mironov S.V. Prevalence of smoking among the medical workers. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranennost-kureniya-sredi-meditsinskih-rabotnikov>. (In Russ.)].
73. Левшин В.Ф., Слепченко Н.И. Курение среди врачей и их готовность к оказанию помощи пациентам в отказе от курения. *Русский медицинский журнал* 2009;17(14):917–20. [Levshin V.F., Slepchenko N.I. Smoking among physicians and their readiness to help patient's quitting smoking. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal* 2009;17(14):917–20. (In Russ.)].
74. Здоровый образ жизни для самих врачей – не указ? Доступно по: <http://www.medpulse.ru/health/prophylaxis/prof/20719.html>. [Health life style for physicians themselves is not order? Available at: <http://www.medpulse.ru/health/prophylaxis/prof/20719.html>. (In Russ.)].
75. Булыгина В.Г., Петелина А.С. Эмоциональное выгорание у специалистов общей и судебно-психиатрической практики (аналитический обзор). *Российский психиатрический журнал* 2013;(6):24–30. [Bulygina V.G., Petelina A.S. Burnout among general practice and forensic psychiatrists (analytical review). *Rossiyskiy psikiatricheskii zhurnal = Russian Psychiatric Journal* 2013;(6):24–30. (In Russ.)].
76. Тöйрү С., Räsänen К., Kujala S. et al. Self-reported health, illness, and self-care among finnish physicians: a national survey. *Arch Fam Med* 2000;9(10):1079–85. PMID: 11115211.
77. Schulz S., Einsle F., Schneider N. et al. Illness behavior of general practitioners – a cross-sectional survey. *Occup Med (Lond)* 2017;67(1):33–7. DOI: 10.1093/occmed/kqw135. PMID: 27697967.

Вклад авторов

Л.Г. Соленова: сбор и анализ материала, написание текста рукописи;

Е.А. Некрасова: сбор материала.

Authors' contributions

L.G. Solenova: collection and analysis of material, article writing;

L.A. Nekrasova: collection of material.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.Г. Соленова/L.G. Solenova: <https://orcid.org/0000-0002-4443-8376>

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 02.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.

Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы

Т.А. Дронова^{1,2}, Н.Н. Бабьшкіна^{1,2}, М.В. Завьялова¹⁻³, С.В. Паталяк¹, Е.М. Слонимская^{1,3},
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышкова^{2,4}

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

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

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

⁴Университет Гейдельберга; Германия, Маннхайм

Контакты: Татьяна Анатольевна Дронова tanyadronova@mail.ru

Введение. Резистентность к гормональной терапии тамоксифеном обусловлена комплексом взаимоотношений сигнальных каскадов рецепторов факторов роста с эстрогеновыми рецепторами.

Цель исследования — комплексная оценка экспрессии матричной РНК (мРНК), белковой экспрессии и полиморфизма генов основных компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути во взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. В исследование включены 95 больных РМЖ, получавшие адъювантную терапию тамоксифеном, из которых у 31 пациентки наблюдалось прогрессирование заболевания на фоне тамоксифена (тамоксифен-резистентная группа), 64 больных составили группу без признаков прогрессирования (тамоксифен-чувствительная группа). Генотипирование полиморфных локусов генов ESR1 (rs2077647, rs2228480, rs1801132), EGFR (rs1468727, rs2227983), AKT1 (rs1130233) и PTEN (rs11202592) проведено с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для оценки экспрессии мРНК генов ESR1, EGFR, AKT1, PTEN использовали метод количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Иммуногистохимически проведено изучение экспрессии ERα, EGFR, Akt (pS473) и PTEN. Показатели безрецидивной выживаемости больных РМЖ проанализированы с помощью кривых Каплана–Майера.

Результаты. Показано, что мутантный аллель C rs2077647 гена ESR1 чаще встречается в опухолях, чувствительных к тамоксифену, по сравнению с опухолями, резистентными к данной терапии ($p = 0,044$). Для тамоксифен-чувствительных опухолей отмечен высокий уровень экспрессии мРНК гена AKT1 по сравнению с тамоксифен-резистентными ($7,27 \pm 5,29$ и $0,02 \pm 0,01$ соответственно, $p = 0,014$). Носительство мутантного генотипа GG rs2228480 гена ESR1 ассоциировано с резистентностью к терапии тамоксифеном ($p = 0,028$). Уровень экспрессии EGFR и Akt (pS473) значимо выше в тамоксифен-резистентной группе по сравнению с тамоксифен-чувствительной ($p = 0,006$ и $0,037$ соответственно). Безрецидивная выживаемость была значимо меньше у пациенток с мутантными генотипами гена ESR1 rs2228480 по сравнению с носительством диких и гетерозиготных вариантов (log rank $p = 0,043$). Наличие положительного уровня экспрессии в опухоли EGFR или Akt (pS473) ассоциировано с низкими показателями безрецидивной выживаемости исследуемой группы пациентов (log rank $p = 0,014$ и $0,048$ соответственно).

Заключение. В качестве потенциальных маркеров, ассоциированных с чувствительностью/резистентностью опухоли к гормональной терапии тамоксифеном, могут рассматриваться полиморфные сайты гена ESR1, экспрессия мРНК AKT1 и уровень экспрессии EGFR и Akt (pS473).

Ключевые слова: эстрогензависимый рак молочной железы, тамоксифен, EGFR/PI3K/AKT-сигнальный каскад, полиморфизм генов

Для цитирования: Дронова Т.А., Бабьшкіна Н.Н., Завьялова М.В. и др. Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2018;5 (3):40–50.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-40-50

Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer

T.A. Dronova^{1,2}, N.N. Babyshkina^{1,2}, M.V. Zavyalova¹⁻³, S.V. Patalyak¹, E.M. Slonimskaya^{1,3},
N.V. Cherdynseva^{1,2}, J.G. Kzhyshkowska^{2,4}

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

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

³Siberian State Medical University; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia;

⁴University of Heidelberg, Mannheim, Germany

Background. It is generally accepted that crosstalk between the growth factor receptor and ER pathways implicated in tamoxifen resistance. The aim of the study was to examine the relationship between mRNA level, protein expression and gene polymorphism of the EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer.

Materials and methods. The study included 95 breast cancer patients who had received adjuvant tamoxifen, of which 31 patients developed recurrence/metastasis after tamoxifen treatment (tamoxifen resistance group), 64 patients did not develop any diseases progression (tamoxifen sensitive group) during the 5 years of follow-up. Genotypes for ESR1 (rs2077647, rs2228480, rs1801132), EGFR (rs1468727, rs2227983), AKT1 (rs1130233) and PTEN (rs11202592) were analyzed using a TaqMan assay. Using reverse transcription-PCR, the relative expression of mRNA for ESR1, EGFR, AKT1 and PTEN was determined. ER α , EGFR, Akt (pS473) and PTEN expression level was evaluated using immunohistochemistry. Progression-free survival (PFS) was estimated by Kaplan – Meier analysis.

Results. The minor allele of ESR1 rs2077647 was more prevalent in tamoxifen sensitive tumors compared to tamoxifen resistant tumors ($p = 0.044$). We found high AKT1 mRNA expression level in tamoxifen sensitive group compared with tamoxifen resistance patients (7.27 ± 5.29 and 0.02 ± 0.01 , respectively, $p = 0.014$). ESR1 rs2228480 was significantly associated with tamoxifen resistance ($p = 0.028$). EGFR and Akt (pS473) protein expression level was significantly higher in the tamoxifen resistance group compared to tamoxifen sensitive breast cancer patients ($p = 0.006$ and 0.037 , respectively). Patients carrying mutant genotypes of ESR1 rs2228480 had a poorer progression-free survival than those carrying wild and heterozygous variants (log rank $p = 0.043$). Positive EGFR tumor expression as well as positive Akt (pS473) expression were significantly associated with shorter PFS (log rank $p = 0.014$ and 0.048 , respectively).

Conclusion. Polymorphic sites of the ESR1 gene, AKT1 mRNA expression, EGFR expression level and Akt (pS473) protein expression can be potential molecular markers associated with tumor sensitivity/resistance to tamoxifen treatment.

Key words: estrogen-dependent breast cancer; tamoxifen; EGFR/PI3K/AKT signaling; gene polymorphism

For citation: Dronova T.A., Babyshkina N.N., Zavyalova M.V. et al. Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):40–50.

Введение

Тамоксифен, селективный модулятор эстрогеновых рецепторов, остается в настоящее время базисным препаратом гормональной терапии как ранних, так и распространенных форм эстрогензависимого рака молочной железы (PMЖ) [1, 2]. Способность тамоксифена конкурировать с эстрогенами за связывание с эстрогеновыми рецепторами α (ER α) приводит к частичному блокированию ER α -сигнального пути, что в значительной степени способствует снижению пролиферативного эффекта стероидов. Использование тамоксифена в адьювантном режиме позволяет значительно увеличить показатели безрецидивной выживаемости больных PMЖ [3]. Однако высокий риск развития рецидива или прогрессирования заболевания на фоне адьювантного применения тамоксифена существенно ограничивает его эффективность [4].

Резистентность к антиэстрогенной терапии – мультифакториальная проблема, в которой задействовано множество сигнальных путей, в том числе сигнальные каскады рецепторов факторов роста, которые взаимодействуют как с эстрогеновыми рецепторами, так и внутриклеточными путями, такими как PI3K/AKT/mTOR [5, 6].

Рецептор эпидермального фактора роста EGFR (HER1/ErbB1), член семейства белков ErbB, является одним из важнейших компонентов PI3K/AKT-сигналинга, осуществляющего регуляцию клеточной пролиферации и злокачественной трансформации клеток при PMЖ [7]. EGFR-PI3K-взаимодействие опосредовано адаптерным белком GAB1, содержащим канонические

сайты связывания с PI3K, что приводит к аллостерической активации каталитической субъединицы p110 PI3K и образованию фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатов (PIP3), необходимых для последующих реакций фосфорилирования Akt [8]. Уровень PIP3 находится под регуляторным контролем противоположно направленных эффекторных реакций PI3K и фосфатазы PTEN [9].

Многочисленные экспериментальные и клинические данные демонстрируют, что гиперэкспрессия EGFR определяет резистентность к тамоксифену в эстроген-положительных опухолях молочной железы [10–12]. Результаты ранее проведенных нами исследований также подтвердили прогностическую значимость статуса экспрессии EGFR как маркера неэффективности адьювантной терапии тамоксифеном [13]. Данные литературы свидетельствуют о том, что высокий уровень экспрессии Akt ассоциирован с низкими показателями общей выживаемости у больных PMЖ, получавших тамоксифен [14]. Напротив, низкий уровень экспрессии PTEN либо потеря экспрессии PTEN коррелирует с развитием рецидива на фоне приема тамоксифена у пациентов с PMЖ, что определяет неблагоприятный исход заболевания [15]. Однако, несмотря на убедительные данные, свидетельствующие о вовлечении EGFR/PI3K-ассоциированных белков в механизмы неэффективности тамоксифена, системный подход к оценке их прогностической значимости у больных эстрогензависимым PMЖ отсутствует.

Цель исследования – комплексная оценка экспрессии матричной РНК (мРНК), белковой экспрессии

и полиморфизма генов основных компонентов EGFR/PI3K/АКТ-сигнального пути во взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым РМЖ.

Материалы и методы

В исследование были включены 95 пациенток с впервые выявленным операбельным РМЖ (T1–4N0–3M0), получавших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2002 по 2014 г. Средний возраст больных составил $54,5 \pm 0,9$ года (30–79 лет). У всех пациенток диагноз эстрогензависимого РМЖ подтвержден морфологически. Определение молекулярного подтипа опухоли проводили иммуногистохимически на основе маркеров ER α , PR, HER2 и Ki-67. Люминальный подтип А РМЖ (опухоль с отрицательной экспрессией HER2, положительной экспрессией рецепторов к эстрогенам и прогестерону и пролиферативной активностью менее 20 %) выявлен у 62 (65,3 %) больных, люминальный подтип В (эстроген/прогестерон рецептор-положительные опухоли как с положительной, так и с отрицательной экспрессией HER2 и высоким уровнем пролиферативной активности ≥ 20 %) – у 33 (34,7 %) пациенток.

Все больные получали комбинированное лечение в объеме оперативного вмешательства, а также гормональной терапии и химиотерапии по показаниям. Адъювантная химиотерапия в виде 4–6 курсов по схеме FAC была проведена 33 (35,5 %) пациенткам. Все больные в адъювантном режиме получали тамоксифен в стандартной дозе 20 мг/сут. Оценка эффективности лечения проводили на основании наличия или отсутствия прогрессирования заболевания, по результатам которой сформированы 2 группы: тамоксифен-чувствительная (больные без выявленных отдаленных метастазов; $n = 64$), и тамоксифен-резистентная (больные с прогрессированием заболевания; $n = 31$). Все случаи прогрессирования были отмечены на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Среднее время до прогрессирования составило $28,5 \pm 17,8$ мес. Исследуемые группы пациенток были сопоставимы по основным клинико-морфологическим признакам и объему проведенного лечения (табл. 1).

Для оценки экспрессии исследуемых генов использованы образцы опухолевой и прилегающей нормальной ткани, полученные во время оперативного вмешательства. Образцы помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и сохраняли при температуре -80 °С (после 24-часовой инкубации при температуре $+4$ °С) для дальнейшего выделения РНК. Белковые продукты исследуемых генов и их полиморфные варианты были изучены в образцах опухолевой ткани, фиксированных в 10 % рН-нейтральном растворе формалина. Продолжительность фиксации составляла не более 18–24 ч. Проводку образцов осуществляли по стандартной методике.

Для оценки полиморфизма генов *ESR1* (rs2077647, rs2228480, rs1801132), *EGFR* (rs1468727, rs2227983),

AKT1 (rs1130233) и *PTEN* (rs11202592) из опухолевых образцов с помощью наборов QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Германия) выделена тотальная ДНК. Качественную и количественную оценку ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (NanoDrop, США). Изучение исследуемых полиморфных локусов выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Последовательность праймеров и проб подбирали с использованием программы OligoAnalysisVector NTI и генетического банка данных www.ncbi.nlm.nih.gov (табл. 2). Реакционная смесь в объеме 15 мкл включала 100 нг геномной ДНК; 0,5–1,5 мкл специфической пары праймеров и проб с концентрацией 1 о.е./мл; 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата; 1,2–2,0 мкл буфера (60 мМ Трис-НСl (рН 8,5 при температуре 25 °С), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 % Тритон X-100) и 0,5–1,0 ед. Taq ДНК-полимеразы (Медиген, Россия). Программу амплификации осуществляли в несколько этапов: денатурация при температуре 95 °С в течение 2 мин с последующими 40 циклами при температуре 95 °С в течение 10 с; отжиг 30 с при специфической температуре для каждой пары праймеров.

Уровень экспрессии генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* оценивали с помощью количественной обратной транскриптазной ПЦР на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Дизайн праймеров и TaqMan-зондов представлен в табл. 3. ПЦР ставили в 3 повторах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при температуре 25 °С), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед. HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг комплементарной ДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94 °С, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °С, 10 с и 2-й шаг 60 °С, 20 с. Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с использованием электрофореза в 2,5 % агарозном геле с 0,2 % бромистым этидием. Относительную экспрессию генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* определяли с помощью метода 2^{- $\Delta\Delta$ CT}. Уровень экспрессии исследуемых генов нормировали по референсному гену *GAPDH*.

Изучение экспрессии ER α , EGFR, Akt (pS473) и PTEN проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим способом по стандартному протоколу. Использовали антитела фирмы Dako к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, RTU, мышинные), EGFR (клон SP9, 1:100), Akt (pS473) (клон 14–5, 1:50) и PTEN (клон 6H2.1, 1:100). Экспрессию ER α оценивали количественным методом гисто-счета (Histo-Score). При этом подсчитывали процент положительных клеток и показатель экспрессии в баллах. Экспрессию EGFR, Akt (pS473) и PTEN оценивали в процентном содержании положительно окрашенных клеток в 10 полях зрения на 1000 клеток. При анализе экспрессии EGFR,

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры больных исследуемых групп

Table 1. Clinical and morphological parameters of the patients in the examined groups

| Параметр Parameter | Тамоксифен-чувствительная группа, n (%) Tamoxifen-sensitive group, n (%) | Тамоксифен-резистентная группа, n (%) Tamoxifen-resistant group, n (%) | p |
|--|---|---|---|
| Возраст, лет: Age, years: | | | |
| ≤50 | 35 (54,7) | 13 (41,9) | 0,343 |
| >50 | 29 (45,3) | 18 (58,1) | |
| Состояние менструальной функции: Menstrual function status: | | | |
| сохранена preserved | 42 (65,6) | 14 (45,2) | 0,093 |
| менопауза menopause | 22 (34,4) | 17 (54,8) | |
| Размер опухоли: Tumor size: | | | |
| T1 | 33 (51,5) | 14 (45,2) | 0,673 (T1 против T3–4) 0,673 (T1 versus T3–4) |
| T2 | 30 (46,9) | 17 (54,8) | |
| T3–4 | 1 (1,6) | 0 (0,0) | |
| Регионарные лимфатические узлы: Regional lymph nodes: | | | |
| N0 | 44 (68,7) | 18 (58,1) | 0,426 |
| N1–3 | 20 (31,3) | 13 (41,9) | |
| Гистологический тип: Histological type: | | | |
| протоковый ductal | 51 (79,7) | 27 (87,1) | 0,471 (протоковый против долькового) 0,471 (ductal versus lobular) |
| дольковый lobular | 9 (14,1) | 3 (9,7) | |
| другие other | 4 (6,2) | 1 (3,2) | |
| Адьювантная химиотерапия: Adjuvant chemotherapy: | | | |
| проводилась was administered | 24 (37,5) | 11 (35,5) | 0,971 |
| не проводилась was not administered | 40 (62,5) | 20 (64,5) | |

Примечание. N0 – без признаков поражения метастазами регионарных лимфатических узлов; N1–3 – метастазы в регионарных лимфатических узлах.

Note. N0 – absence of signs of metastatic lesions in the regional lymph nodes; N1–3 – metastases in the regional lymph nodes.

Akt (pS473) и PTEN учитывали положительное мембранное и/или цитоплазматическое окрашивание (рис. 1).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0 и SPSS 21.0. Распределение генотипов исследованных полиморфных локусов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий согласия χ^2 или двусторонний критерий Фишера. Безрецидивную выживаемость больных РМЖ анализировали с помощью кривых Каплана–Майера и *log rank*-теста. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии

с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288) на основании разрешения локального комитета по био-медицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Результаты

Результаты генотипирования полиморфных локусов генов *ESR1* (rs2077647, rs2228480, rs1801132), *EGFR* (rs1468727, rs2227983), *AKT1* (rs1130233) и *PTEN* (rs11202592) у больных РМЖ представлены в табл. 4. Показано, что мутантный аллель C rs2077647 гена *ESR1* чаще встречается в опухолях, чувствительных к тамоксифену по сравнению с опухолями, резистентными к данной терапии (60,8 и 44,0 % соответственно; $p = 0,044$). Кроме того, выявлено, что тамоксифен-чувствительную

Таблица 2. Последовательность олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для анализа полиморфизма исследуемых генов

Table 2. Oligonucleotide primer and TaqMan probe sequences for analysis of polymorphisms in the studied genes

| Локус Locus | Последовательность праймеров, 5'–3' 5'–3' primer sequence | Последовательность зондов, 5'–3' 5'–3' probe sequence | Температура отжига, °C Annealing temperature, °C |
|---------------------------|--|--|---|
| <i>ESR1</i> rs2228480 | GCTCTACTTCATCGCATTTCCT TGCAGCAGGGATTATCTGAAC | FAM-AGGGTTTCCCTGCCACAGTCTG ROX-TTCCCTGCCACGGTCTGAGAG | 60 |
| <i>ESR1</i> rs2077647 | CACGGACCATGACCATGAC GCTCCAGCTCGTTCCTT | FAM-CCACACCAAAGCATCCGGGA ROX-TCCACACCAAAGCATCTGGGATG | 57 |
| <i>ESR1</i> rs1801132 | CCAGATGGTCAGTGCCTTG CTGAAGGGTCTGGTAGGATCA | FAM-ATGCTGAGCCCCGATACTCTA ROX-ATGCTGAGCCCCCATACTCTA | 60 |
| <i>EGFR</i> rs1468727 | CCTGTTTTACTCTCTGGGCAT ATTATGTGATTTGTTCTGAGCCTAT | FAM-TATTTAGGAGCAGGATAAGAGGACCA ROX-GGAGTAGGATAAGAGGACCAAGTTCA | 60 |
| <i>EGFR</i> rs2227983 | AGGTCTGCCATGCCTTGT CTTGCCACGCATTCCCT | FAM-AGCCCAAGGACTGCGTCTCTT ROX-GAGCCCAGGGACTGCGTCT | 60 |
| <i>AKT1</i> rs1130233 | GTGTGCCTCAGGTTGCG TCCAGGGCTGACACAATCT | FAM-GGAACGTGTGTTCTCCGAGGA ROX-CACCGTGTCTTCTCCGAGGAC | 60 |
| <i>PTEN</i> rs11202592 | GCTTCTGCCATCTCTCTCCT GTTTCTGCTAACGATCTCTTGA | FAM-TTTTCTTCAGCCACAGGGTCC ROX-CACAGGCTCCAGACATGACA | 60 |

Таблица 3. Последовательность олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для анализа экспрессии исследуемых генов

Table 3. Oligonucleotide primer and TaqMan probe sequences for expression analysis of the studied genes

| Ген Gene | Последовательность праймеров, 5'–3' 5'–3' primer sequence | Последовательность зондов, 5'–3' 5'–3' probe sequence |
|-------------|--|--|
| <i>ESR1</i> | CAGGGTGGCAGAGAAAGATT GTAGCGAGTCTCCTTGGA | FAM-TGACAAGGGAAGTATGGCTATGGA |
| <i>EGFR</i> | CTCCATGCCTTTGAGAACCTA CCAAGGATGTTATGTTCCAGGCT | FAM-CGGCAGGACCAAGCAACAT |
| <i>AKT1</i> | CTTCATCATCCGCTGCCT TCCTCCTCCTCCTGCTTCT | FAM-GAGGAGCGGGAGGAGTGGA |
| <i>PTEN</i> | AGCCGTTACCTGTGTGTGG CTGGTCTGTTATGAAGAATGTA | FAM-TCCACAAACAGAACAAGATGCTAAA |

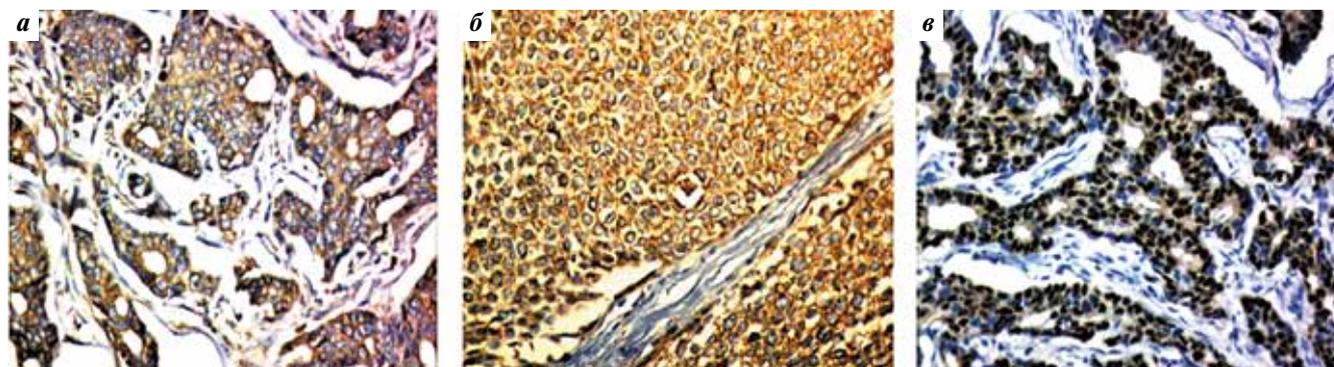


Рис. 1. Иммуногистохимически положительная экспрессия EGFR (а), Akt (pS473) (б) и PTEN (в) в опухолевой ткани молочной железы. Окраска диаминобензидином и гематоксилином (× 200)

Fig. 1. Immunohistochemically positive expression of EGFR (a), Akt (pS473) (b), and PTEN (c) in breast tumor tissue. Diaminobenzidine and hematoxylin staining (× 200)

Таблица 4. Распределение генотипов и аллелей генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* у больных исследуемых группTable 4. Distribution of *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* gene genotypes and alleles in patients of the studied groups

| Генотип/аллель Genotype/allele | <i>n</i> | Тамоксифен-чувствительная группа, <i>n</i> (%) Tamoxifen-sensitive group, <i>n</i> (%) | Тамоксифен-резистентная группа, <i>n</i> (%) Tamoxifen-resistant group, <i>n</i> (%) | <i>p</i> |
|-----------------------------------|----------|--|--|--|
| <i>ESR1</i> rs2077647 | | | | |
| TT | 23 | 13 (21,7) | 10 (40) | 0,075 TT против CC 0,075 TT versus CC |
| TC | 27 | 21 (35,0) | 8 (32) | |
| CC | 33 | 26 (43,3) | 7 (28) | |
| T | | 47 (39,2) | 28 (56) | 0,044 |
| C | | 73 (60,8) | 22 (44) | |
| <i>ESR1</i> rs2228480 | | | | |
| GG | 64 | 46 (78) | 18 (72) | 0,028 GG против AA 0,028 GG versus AA |
| GA | 17 | 13 (22) | 4 (16) | |
| AA | 3 | 0 (0) | 3 (12) | |
| G | | 105 (89) | 40 (80) | 0,121 |
| A | | 13 (11) | 10 (20) | |
| <i>ESR1</i> rs1801132 | | | | |
| CC | 56 | 37 (63,8) | 19 (76) | 0,593 CC против GG 0,593 CC versus GG |
| CG | 23 | 18 (31,0) | 5 (20) | |
| GG | 4 | 3 (5,2) | 1 (4) | |
| C | | 92 (79,3) | 43 (86) | 0,310 |
| G | | 24 (20,7) | 7 (14) | |
| <i>EGFR</i> rs2227983 | | | | |
| GG | 43 | 30 (53,6) | 13 (54,2) | 0,656 GG против AA 0,656 GG versus AA |
| GA | 30 | 20 (35,7) | 10 (41,6) | |
| AA | 7 | 6 (10,7) | 1 (4,2) | |
| G | | 80 (71,4) | 36 (75,0) | 0,643 |
| A | | 32 (28,6) | 12 (25,0) | |
| <i>EGFR</i> rs1468727 | | | | |
| TT | 43 | 32 (54,2) | 11 (44) | 0,956 TT против CC 0,956 TT versus CC |
| TC | 13 | 6 (10,2) | 7 (28) | |
| CC | 28 | 21 (35,6) | 7 (28) | |
| T | | 70 (59,3) | 29 (58) | 0,873 |
| C | | 48 (40,7) | 21 (42) | |
| <i>AKT1</i> rs1130233 | | | | |
| GG | 62 | 43 (71,7) | 19 (76) | 0,491 GG против AA 0,491 GG versus AA |
| GA | 21 | 15 (25,0) | 6 (24) | |
| AA | 2 | 2 (3,3) | 0 (0) | |
| G | | 101 (84,2) | 44 (88) | 0,507 |
| A | | 19 (15,8) | 6 (12) | |
| <i>PTEN</i> rs11202592 | | | | |
| CC | 31 | 21 (35,6) | 10 (40) | 0,702 CC против GG 0,702 CC versus GG |
| CG | 53 | 38 (64,4) | 15 (60) | |
| GG | 0 | 0 (0) | 0 (0) | |
| C | | 80 (67,8) | 35 (70) | 0,778 |
| G | | 38 (32,2) | 15 (30) | |

группу пациентов отличает от тамоксифен-резистентной группы отсутствие мутантных генотипов GG rs2228480 гена *ESR1* (0 и 12 % соответственно; $p = 0,028$). Для других полиморфных локусов изучаемых генов значимой связи с эффективностью терапии тамоксифеном не обнаружено.

Для определения уровня транскрипционной активности генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1* и *PTEN* изучены парные

образцы тканей опухоли молочной железы и условно нормальной ткани в 2 группах пациенток. Выявлено, что чувствительные и резистентные опухоли отличаются по уровню экспрессии 2 генов – *ESR1* и *AKT1*. Повышение уровня экспрессии *ESR1* было характерно для тамоксифен-чувствительной группы больных по сравнению с тамоксифен-резистентной, однако

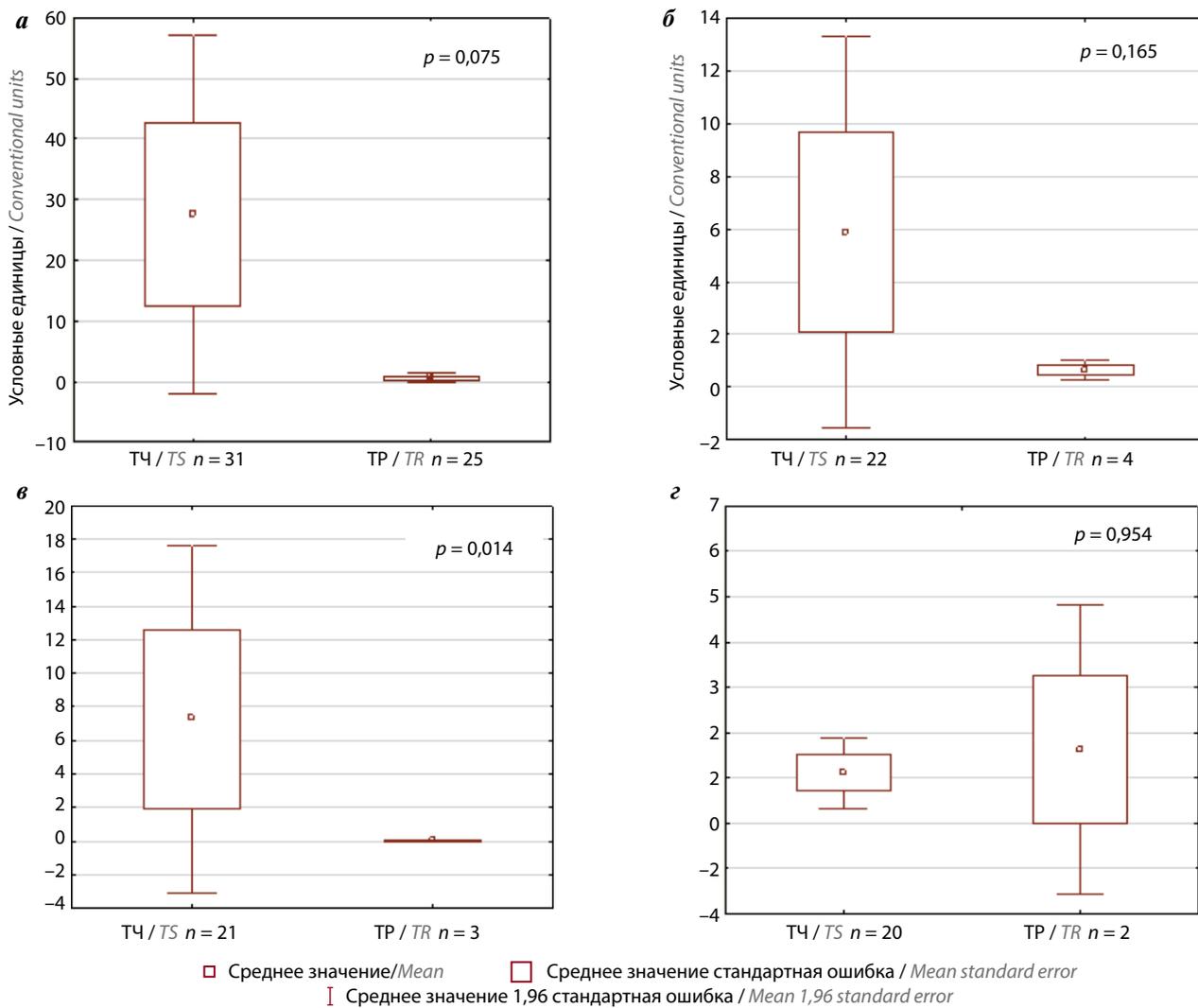


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *ESR1* (а), *EGFR* (б), *AKT1* (в) и *PTEN* (г) у больных РМЖ в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном. Приведены средние значения \pm SE. ТЧ – тамоксифен-чувствительная группа, ТР – тамоксифен-резистентная группа

Fig. 2. *ESR1* (a), *EGFR* (б), *AKT1* (в), and *PTEN* (г) gene expression levels in patients with breast cancer depending on tamoxifen therapy effectiveness. Mean values \pm SE. TS – tamoxifen-sensitive group, TR – tamoxifen-resistant group

Таблица 5. Уровень экспрессии *EGFR*, *Akt* (pS473) и *PTEN* в образцах опухолевой ткани у больных исследуемых групп

Table 5. *EGFR*, *Akt* (pS473), and *PTEN* expression levels in the tumor tissue samples from the patients of the studied groups

| Параметр Parameter | n | Тамоксифен-чувствительная группа, n (%) Tamoxifen-sensitive group, n (%) | Тамоксифен-резистентная группа, n (%) Tamoxifen-resistant group, n (%) | p |
|---------------------------|----|---|---|-------|
| EGFR: | | | | |
| отрицательная negative | 38 | 27 (75,0) | 11 (40,7) | 0,006 |
| положительная positive | 25 | 9 (25,0) | 16 (59,3) | |
| Akt (pS473): | | | | |
| отрицательная negative | 18 | 17 (77,3) | 1 (25,0) | 0,037 |
| положительная positive | 8 | 5 (22,7) | 3 (75,0) | |
| PTEN: | | | | |
| отрицательная negative | 15 | 12 (54,5) | 3 (75,0) | 0,426 |
| положительная positive | 11 | 10 (45,5) | 1 (25,0) | |

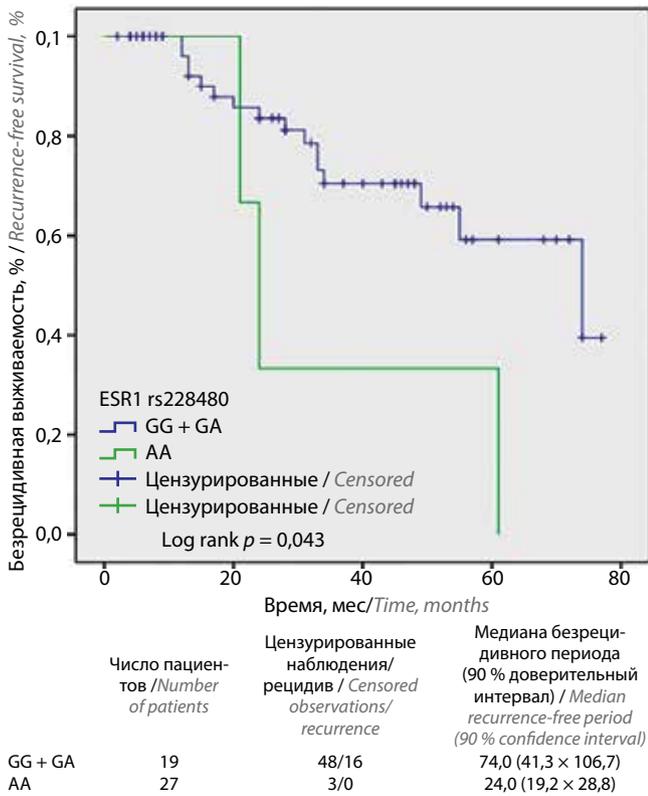
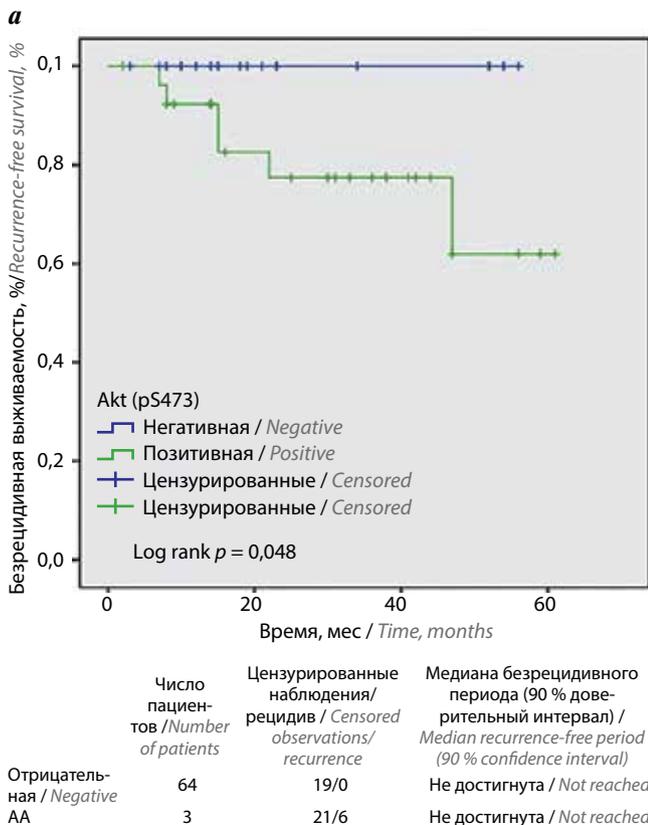


Рис. 3. Показатели безрецидивной выживаемости у больных РМЖ в зависимости от генотипов гена *ESR1* (rs2228480)
Fig. 3. Recurrence-free survival in patients with breast cancer depending on *ESR1* (rs2228480) gene genotype



различия не достигали статистической значимости ($27,56 \pm 15,07$ и $0,53 \pm 0,42$ соответственно; $p = 0,075$) (рис. 2a). Более значимое повышение содержания мРНК гена *AKT1* отмечено у пациенток с РМЖ без прогрессирования заболевания, чем среди больных, не отвечающих на терапию тамоксифеном ($7,27 \pm 5,29$ и $0,02 \pm 0,01$ соответственно; $p = 0,014$) (рис. 2в).

При изучении уровня экспрессии белковых продуктов генов *EGFR*, *AKT1* и *PTEN* показано, что риск прогрессирования заболевания на фоне тамоксифена значительно выше у больных с положительной экспрессией *EGFR* и Akt (pS473) ($p = 0,006$ и $0,037$ соответственно; табл. 5).

Для оценки потенциальной прогностической значимости исследуемых маркеров мы провели анализ безрецидивной выживаемости у пациенток с РМЖ. Выявлено, что носительство мутантного варианта гена *ESR1* rs2228480 сопряжено с низкими показателями безрецидивной выживаемости у больных эстрогензависимым РМЖ ($\log rank p = 0,043$) (рис. 3). Наличие положительного уровня экспрессии в опухоли *EGFR* и Akt (pS473) ассоциировано со значительным уменьшением времени до прогрессирования заболевания у пациентов исследуемой группы ($\log rank p = 0,014$ и $0,048$ соответственно) (рис. 4).

Обсуждение

Принимая во внимание ранее полученные нами данные о взаимосвязи высокого уровня экспрессии

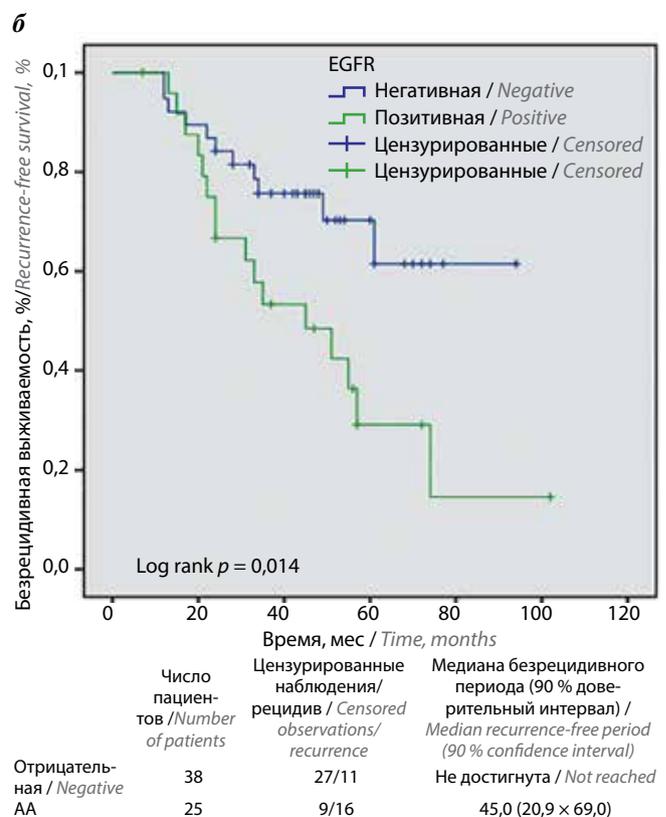


Рис. 4. Показатели безрецидивной выживаемости у больных РМЖ в зависимости от экспрессии Akt (pS473) (а) и EGFR (б)
Fig. 4. Recurrence-free survival in patients with breast cancer depending on Akt (pS473) (a) and EGFR (б) gene expression

EGFR, а также ассоциации мутантного варианта гена *ESR1* rs2228480 с низкой эффективностью гормональной терапии тамоксифеном у больных РМЖ [13], мы провели комплексную оценку основных компонентов EGFR/PI3K/АКТ-сигнального пути в группах пациентов с эстрогензависимым РМЖ, различных по эффективности лечения тамоксифеном.

В ходе настоящего исследования мы последовательно проанализировали генетическую компоненту (полиморфизм генов и уровень экспрессии мРНК), а также белковый статус EGFR/PI3K-ассоциированных факторов у больных РМЖ тамоксифен-резистентной и тамоксифен-чувствительной групп.

Мы показали, что потенциальными маркерами, определяющими чувствительность к тамоксифену, являются SNP rs2077647 гена *ESR1* и уровень экспрессии мРНК гена *AKT1*. Неэффективность терапии тамоксифеном может быть связана с наличием мутантных генотипов гена *ESR1* rs2228480 и положительного экспрессионного статуса белков EGFR и Akt (pS473). Важно, что выявленные маркеры резистентности продемонстрировали значимый прогностический потенциал в отношении показателей выживаемости у больных эстрогензависимым РМЖ.

SNP rs2077647, локализуемой в 1-м экзоне гена *ESR1*, является функционально нейтральной мутацией, которая не приводит к изменению биологической активности продукта экспрессии гена [16]. Получены данные о том, что мутантный аллель С данного полиморфного варианта является протективным фактором в отношении развития РМЖ [17, 18]. Возможно, потенциальный «благоприятный» эффект в отношении риска развития РМЖ и чувствительности к гормональной терапии обусловлен сильным неравновесным сцеплением данного полиморфизма с близко расположенными SNP локусами *ESR1*.

SNP rs2228480 представляет собой синонимичную нуклеотидную замену 8-м экзоне гена *ESR1*, функциональная роль которой полностью не известна. Однако полагают, что данная точечная мутация может способствовать нарушению сайтов связывания эстрогеновых рецепторов для взаимодействия с коактиваторами [19]. Вероятно, что результатом таких нарушений может быть образование функционально неактивного рецептора, неспособного полноценно взаимодействовать с тамоксифеном, что потенциально определяет развитие резистентности. Следует отметить, что подобные исследования связи *ESR1* rs2228480 с эффективностью тамоксифена у больных РМЖ в отечественных и зарубежных источниках отсутствуют.

Участие EGFR в механизмах резистентности к гормональной терапии в настоящее время не подлежит сомнению. Гиперэкспрессия EGFR в опухолях, не отвечающих на тамоксифен, и ее неблагоприятная прогностическая значимость у больных эстроген-положительным РМЖ продемонстрирована в настоящем исследовании и подтверждена многочисленными опубликованными данными [20–22].

В отличие от EGFR, определение экспрессии мРНК *AKT1* как потенциального маркера резистентности к тамоксифену остается в настоящее время спорным. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют о прямой зависимости высокого уровня экспрессии *AKT1* и развития тамоксифен-чувствительного фенотипа клеток опухолевых линий РМЖ [23]. Результаты клинических работ указывают на отсутствие связи экспрессии мРНК *AKT1* с ответом на тамоксифен [24, 25]. Однако исследования, касающиеся белкового продукта гена *AKT1*, позволили выявить четкие ассоциации экспрессии Akt (pS473) с неблагоприятным исходом у больных РМЖ на фоне адъювантного применения тамоксифена [14]. Показано, что высокий уровень ядерной экспрессии Akt (pS473) коррелирует с неэффективным ответом на тамоксифен у больных РМЖ в период постменопаузы без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов [26]. Вероятно, что более существенным и информативным в прогностическом плане является уровень продукции фосфорилированной формы белка по сравнению с уровнем экспрессии мРНК, поскольку именно фосфорилирование (в большей степени по аминокислотному остатку Ser-473) определяет функциональную активность Akt.

Заключение

Таким образом, на основании проанализированных данных литературы и результатов настоящего исследования можно предполагать высокую степень активации EGFR/PI3K/АКТ-сигнального пути в опухолях, резистентных к тамоксифену, обусловленную, в том числе, значительной экспрессией EGFR и фосфорилированной формы белка Akt. Вклад в реализацию тамоксифен-чувствительного/резистентного фенотипа опухоли вносит как функциональная активность рецепторных тирозинкиназ (EGFR, в частности), обеспечивающих фосфорилирование ER α и его лиганднезависимую активацию, так и полиморфные сайты *ESR1*, затрагивающие лигандзависимые (SNP rs2228480) и лиганднезависимые (SNP rs2077647) области гена, способствующие изменению активности ER α .

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Senkus E., Kyriakides S., Penault-Llorca F. et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24:vi7–vi23. DOI: 10.1093/annonc/mdt284. PMID: 26314782.
2. Burstein H.J., Lacchetti C., Anderson H. et al. Adjuvant Endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on ovarian suppression. *J Clin Oncol* 2016;34(14):1689–701. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.9573. PMID: 26884586.
3. Crew K.D., Albain K.S., Hershman D.L. et al. How do we increase uptake of tamoxifen and other anti-estrogens for breast cancer prevention? *NPJ Breast Cancer* 2017;3(20):1–7. DOI: 10.1038/s41523-017-0021-y. PMID: 28649660.
4. Pan H., Gray R., Braybrooke J. et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med* 2017;377:1836–46. DOI: 10.1056/NEJMoa1701830. PMID: 29117498.
5. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)* 2012;20(3):256–7. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.3.256. PMID: 24130921.
6. Velloso F.J., Bianco A.F., Farias J.O. et al. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *Oncol Targets Ther* 2017;10:5491–524. DOI: 10.2147/OTT.S142154. PMID: 29200866.
7. Wee P., Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers(Basel)* 2017;9(5):52. DOI: 10.3390/cancers9050052. PMID: 28513565.
8. Paplomata E., O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol* 2014;6(4):154–66. DOI: 10.1177/1758834014530023. PMID: 25057302.
9. Lee J.J., Loh K., Yap Y.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med* 2015;12(4):342–54. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0089. PMID: 26779371.
10. Giltneane J.M., Ryden L., Cregger M. et al. Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3007–14. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.9938. PMID: 17634479.
11. Massarweh S., Osborne C.K., Creighton C.J. et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 2008;68(3):826–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2707. PMID: 18245484.
12. Kim S., Lee J., Oh S.J. et al. Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncol Rep* 2015;34(3):1613–9. DOI: 10.3892/or.2015.4116. PMID: 26166014.
13. Babyshkina N., Vtorushin S., Zavyalova M. et al. The distribution pattern of ER α expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Med* 2017;17(3):383–93. DOI: 10.1007/s10238-016-0428-z. PMID: 27225751.
14. Kirkegaard T., Witton C.J., McGlynn L.M. et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol* 2005;207:139–46. DOI: 10.1002/path.1829. PMID: 16088978.
15. Tanic N., Milovanovic Z., Tanic N. et al. The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2012;13(12):1165–74. DOI: 10.4161/cbt.21346. PMID: 22892847.
16. Li T., Zhao J., Yang J. et al. A Meta-analysis of the association between ESR1 genetic variants and the risk of breast cancer. *PLoS One* 2016;11(4):e0153314. DOI: 10.1371/journal.pone.0153314. PMID: 27070141.
17. Hsiao W.C., Young K.C., Lin S.L. et al. Estrogen receptor-alpha polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004;6(3):180–6. DOI: 10.1186/bcr770. PMID: 15084241.
18. Fernandez L.P., Milne R.L., Barroso E. et al. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer* 2006;119(2):467–71. DOI: 10.1002/ijc.21847. PMID: 16477637.
19. Anghel A., Raica M., Narita D. Estrogen receptor alpha polymorphisms: correlation with clinicopathological parameters in breast cancer. *Neoplasma* 2010;57(4):306–15. PMID: 20429621.
20. Chong K., Subramanian A., Sharma A. et al. Measuring IGF-1, ER- α and EGFR expression can predict tamoxifen-resistance in ER-positive breast cancer. *Anticancer Res* 2011;31(1):23–32. PMID: 21273576.
21. Xuan Q.J., Wang J.X., Nanding A. et al. Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2014;20(3):619–24. DOI: 10.1007/s12253-013-9740-z. PMID: 24414992.
22. Bae S.Y., Nam S.J., Lee S.K. et al. Tamoxifen resistance: EGFR expression in hormone receptor-positive and HER2 negative breast cancer. In: Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium: Report abstract *Cancer Res* 2017;77(4):9–36. DOI: 10.1158/1538-7445.
23. van Agthoven T., Veldscholte J., Smid M. et al. Functional identification of genes causing estrogen independence of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114(1):23–30. DOI: 10.1007/s10549-008-9969-5. PMID: 18351453.
24. van Agthoven T., Godinho M.F., Wulfkuhle J.D. et al. Protein pathway activation mapping reveals molecular networks associated with antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 2012;131(9):1998–2007. DOI: 10.1002/ijc.27489.
25. Riggio M., Perrone M.C., Polo M.L. et al. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep* 2017;7:44244. DOI: 10.1038/srep44244. PMID: 28287129.
26. Bostner J., Karlsson E., Pandiyan M.J. et al. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(2):397–406. DOI: 10.1007/s10549-012-2376-y. PMID: 23242584.

Вклад авторов

Т.А. Дронова: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Н.Н. Бабышкина: написание текста рукописи, анализ полученных данных;

М.В. Завьялова, С.В. Паталяк: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Е.М. Слонимская: получение данных для анализа, разработка дизайна исследования;

Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

T.A. Dronova: article writing, reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;

N.N. Babyshkina: article writing, analysis of the obtained data;

M.V. Zavyalova, S.V. Patalyak: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

E.M. Slonimskaya: obtaining data for analysis, developing the research design;

N.V. Cherdyntseva, J.G. Kzhyshkowska: developing the research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Дронова/T.A. Dronova: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>

Н.Н. Бабышкина/N.N. Babyshkina: <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>

М.В. Завьялова/M.V. Zavyalova: <https://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

С.В. Паталяк/S.V. Patalyak: <https://orcid.org/0000-0002-9468-1980>

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

Н.В. Чердынцева/N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

Ю.Г. Кжышковска/J.G. Kzhyshkowska: <https://orcid.org/0000-0003-0898-3075>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 17-29-06037 офи_м «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

Financing. The study was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 17-29-06037 «Genomic regulation of the breast cancer progression during chemotherapy».

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья поступила: 05.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 05.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.

Молекулярно-генетическая гетерогенность меланомы глаза

Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, В.В. Назарова, И.А. Утяшев, К.В. Орлова,
Д.А. Понкратова, Д.В. Мартынков, Л.В. Демидов

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

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко ntmazurenko@mail.ru

Введение. Меланома является наиболее распространенной опухолью глаза у взрослых и представлена 2 основными типами: увеальной (УМ) и конъюнктивальной (КМ), которые отличаются по клиническим (частота распространения, локализация, гистология) и генетическим характеристикам.

Цель исследования – сравнительное изучение молекулярно-генетических особенностей опухолей у пациентов с меланомой глаза.

Материалы и методы. С использованием метода секвенирования по Сэнгеру для анализа ДНК, выделенной после микродиссекции срезов опухолевых биопсий, проведено сравнительное изучение молекулярного профиля 78 опухолей глаза, среди них 73 УМ (хориоидеи, цилиарного тела и радужки) и 5 КМ. Исследован следующий спектр мутаций: GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS.

Результаты. Мутации GNAQ и GNA11 выявлены в 81 % (59/73) УМ, соответственно в 42 % (31/73) и 38 % (28/73). В первичной УМ чаще присутствовали мутации GNAQ (63 %), а в метастатической – GNA11 (42 %). Наблюдались различия в распространенности мутаций GNAQ и GNA11 в зависимости от типа клеток УМ. Мутации GNAQ чаще обнаружены в веретенчатых УМ (55 %), а GNA11 – в эпителиоидных УМ (42 %). Не выявлено различий в частоте мутаций GNAQ/GNA11 в зависимости от возраста пациентов (моложе и старше 50 лет), а также в общей выживаемости пациентов УМ с мутациями GNAQ или GNA11. Кроме того, выявлены 3 УМ с мутациями KIT и 2 УМ с мутацией BRAF. В УМ хориоидеи, цилиарного тела и радужки существенных различий в частоте мутаций онкогенов не наблюдалось. Молекулярный профиль КМ отличается от профиля мутаций УМ и сходен с таковым для меланомы кожи: в 3 (60 %) КМ обнаружена мутация BRAF V600E, а в 1 (20 %) – NRAS Q61K.

Заключение. Генетический анализ свидетельствует о гетерогенности меланомы глаза и важен для характеристики и лечения заболевания.

Ключевые слова: увеальная меланома, конъюнктивальная меланома, мутации GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS

Для цитирования: Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Назарова В.В. и др. Молекулярно-генетическая гетерогенность меланомы глаза. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):51–8.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-51-58

Molecular and genetic diversity in melanoma of eye

N.N. Mazurenko, I.V. Tsyganova, V.V. Nazarova, I.A. Utyashev, K.V. Orlova, D.A. Ponkratova, D.V. Martinkov, L.V. Demidov

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

Background. Ocular melanoma is the most common cancer of adult eye and is represented by two main subtypes of uveal (UM) and conjunctival (CM) melanoma with distinct clinical (frequency, localization, histology) and genomic features.

The objective is to compare molecular and genetic characteristics of tumors in patients with melanoma of the eye.

Materials and methods. In this study molecular profiling of 78 tumors including 73 UM (choroidea, ciliar body and iris) and 5 CM, was evaluated. DNA was isolated from tumor cells collected by macrodissection of FEPE sections of tumor biopsies using proteinase K. The following genes were studied by Sanger sequencing: GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS.

Results. Mutations in GNAQ and GNA11 were found in 81 % (59/73) of UM, in 42 % (31/73) and 38 % (28/73) of cases correspondently. GNAQ mutations were more frequent in primary UM (63 %), while GNA11 mutations dominated in metastatic UM (42 %). There was a correlation between frequency of GNAQ/GNA11 mutations and histologic type of UM. GNAQ mutations were identified in 55 % of spindle cell UM, while GNA11 mutations were more frequent in epithelioid cell UM (42 %). There were no differences in frequency of GNAQ/GNA11 mutations in UM of patients of different age (younger and elder 50 years). There was no statistically difference in UM patient outcome with GNAQ or GNA11 mutations. We also detected 3 UM with KIT mutations and 2 UM with BRAF mutations. There was no big difference in frequency of «driver mutations» in UM of choroidea, ciliar body and iris. Molecular profiling of conjunctival melanoma (CM) resembles that of cutaneous melanoma of skin: in 3 (60 %) CM BRAF V600E was identified and in 1 (20 %) – NRAS Q61K.

Conclusion. Genetic analysis reveals wide diversity of melanoma of eye and is important for it characterization and treatment.

Key words: uveal melanoma, conjunctival melanoma, GNAQ, GNA11, KIT, BRAF, NRAS mutations

For citation: Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Nazarova V.V. et al. Molecular and genetic diversity in melanoma of eye. Uspekh molekul'nyy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(3):51–8.

Введение

Меланома глаза является распространенной опухолью глаза у взрослых и представлена 2 основными типами, которые отличаются по клиническим (частота распространения, локализация, гистология) и генетическим характеристикам [1].

Уvealная меланома (УМ) — наиболее распространенная злокачественная опухоль глаза нейроэктодермального происхождения, заболеваемость которой в мире составляет примерно 7000 человек ежегодно. Частота УМ колеблется от 0,2–0,3 случая на 1 млн населения Африки/Азии до 4–10 случаев на 1 млн белого населения по всему миру [2]. Этот редкий подтип меланомы (3,7–5,0 % всех типов меланомы) возникает в результате злокачественной трансформации меланоцитов сосудистой оболочки глазного яблока (хориоидеи) (>80 %), реснитчатого (цилиарного) тела (6–15 %) или радужки (4–6 %) [3]. Опухоль отличается агрессивным течением: у 50 % пациентов, независимо от метода лечения первичной опухоли, развиваются метастазы, и вследствие этого смертность достигает 53 % в течение 5-летнего периода [4]. УМ метастазирует гематогенным путем, чаще всего в печень (90 %), легкие (25 %), кости (15 %), кожу (10 %) [5, 6]. Медиана продолжительности жизни при метастазах в печени у пациентов с УМ составляет 9 мес, а в группе пациентов с экстрапеченочными проявлениями — 19–28 мес. К факторам неблагоприятного прогноза при УМ относятся возраст больного, размер первичной опухоли, клеточный состав (эпителиоидный или смешанный гистологический тип клеток), экстраокулярный рост, хромосомные изменения (моносомия хромосомы 3 и/или амплификация хромосомы 8) [2, 4].

УМ отличается от меланомы кожи и меланомы слизистых оболочек как по клиническому течению, так и по молекулярно-генетическим свойствам. Основные молекулярные нарушения, характерные для меланомы кожи (мутации *BRAF*, *NRAS*), не участвуют в запуске патологических процессов в УМ. В 60 % случаев УМ отмечают экспрессию тирозинкиназного рецептора *KIT*, чаще всего из-за амплификации гена, тогда как мутации гена *KIT* в УМ редки (9 %) [7].

Специфичными для УМ являются активирующие мутации генов *GNAQ* и *GNA11* (83 %), кодирующих альфа-субъединицы гетеротримерных G-белков G_{α_q} и $G_{\alpha_{11}}$, заякоренных на мембране [8–10]. Вследствие активирующих мутаций блокируется ГТФазная активность альфа-субъединицы и G-белок остается в активном состоянии. В дальнейшем происходит передача сигнала на посредники — аденилатциклазу и фосфолипазу C с последующей активацией протеинкиназ MEK и ERK, что приводит к стимуляции клеточной пролиферации или к активации транскрипции генов клеточного цикла: *CCND1* (cyclin-D1) и *CCTB1* [11]. Активирующие соматические мутации *GNAQ* или *GNA11* являются ранним событием и не связаны с наследственными и семейными случаями УМ [8, 12]. Мутации

GNA11 чаще, чем *GNAQ*, встречаются в метастазирующей меланоме, соответственно в 60 и 20 %, и наличие мутации *GNA11* отрицательно коррелирует со сроками выживаемости пациентов. Таким образом, мутации *GNA11* имеют прогностическое значение, такие опухоли ассоциированы с высоким риском метастазирования и худшим прогнозом, чем меланома с мутацией *GNAQ* [13].

Меланома радужки менее распространена (4–10 %), и в ней, в отличие от меланомы хориоидеи и цилиарного тела, встречаются не только мутации *GNAQ* или *GNA11*, но и мутации *BRAF*, *NRAS*, что объясняют большей экспозицией радужки облучению ультрафиолетом [14, 15]. Таким образом, меланома радужки имеет молекулярный профиль, сравнимый как с меланомой хориоидеи, так и с меланомой кожи, что позволяет рассматривать меланому радужки как отдельный подтип меланомы [15]. Меланома радужки возникает в более молодом возрасте и считается менее агрессивной с более благоприятным прогнозом, чем меланома хориоидеи, тогда как меланома цилиарного тела, наоборот, чаще склонна к метастазированию по сравнению с меланомой хориоидеи [3, 14].

Значительно реже, чем УМ, у 5 % больных меланомой глаза, встречается конъюнктивальная меланома (КМ), у лиц европеоидной расы — с частотой 0,2–0,8 % на 1 млн населения [3, 16]. Она возникает из меланоцитов базального слоя эпителия конъюнктивальной мембраны и сходна с меланомой слизистых оболочек. В отличие от УМ, КМ метастазирует сначала лимфогенным путем, а затем дает метастазы в легкие, печень, мозг [3, 16]. Средняя 10-летняя смертность при КМ составляет 30 %. КМ отличается от УМ по спектру «драйверных» мутаций и содержит мутации *BRAF* и *NRAS*, подобно меланоме кожи [16, 17].

Ранее при исследовании небольшой выборки пациентов с первичной УМ мы выявили мутации *GNAQ* у 41 % больных (*GNA11* еще не были описаны) и мутации *KIT* — у 11 % пациентов [18].

Цель исследования — сравнительное изучение молекулярно-генетических особенностей опухолей у 78 пациентов с меланомой глаза, из которых у 73 диагностирована УМ.

Материалы и методы

В работу включены данные 78 больных меланомой глаза, обратившихся в РОНЦ (ныне НМИЦ онкологии) им. Н.Н. Блохина по поводу лечения метастазов в 2013–2017 г. Все больные получали первичное лечение (энуклеация, радиотерапия либо лазерное лечение) в различных офтальмологических клиниках.

Для генетического исследования использовали образцы фиксированной удаленной опухоли УМ в парафиновых блоках или биопсии метастатического очага, чаще в печени. Примерно у половины пациентов с метастазами исследованы биопсии метастазов, у остальных — образцы первичных опухолей. Морфологическая

характеристика и гистологическая верификация опухолевой ткани проведены в отделении патологической анатомии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Препараты ДНК получали с помощью протеиназы К (Novagen, США) из опухолевых клеток, собранных в результате макродиссекции депарафинизированных срезов опухолевых биопсий. Анализ мутаций выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к «горячим точкам» генов *GNAQ* и *GNA11* (экзоны 5 и 4), *KIT* (экзоны 11, 13 и 17), *BRAF* (экзон 15) и *NRAS* (экзоны 2 и 3) [18, 19]. После разделения в агарозном геле ПЦР-продукты выделяли с использованием набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System (Promega, США) и секвенировали по Сэнгеру на ABI PRISM 3100-Avant с помощью реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator Vol. 3.1. Все случаи УМ без мутаций повторно исследовали на наличие мутации *BRAF* с использованием ПЦР в реальном времени с плавлением на приборе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты

Генетическое исследование проведено с препаратами опухолевой ДНК 78 больных меланомой глаза. Клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1. У 73 (94 %) пациентов диагностирована УМ, у 5 (6 %) – меланома конъюнктивы орбиты.

Уvealная меланома. Среди пациентов с УМ у 64 (88 %) диагностирована меланома хориоидеи, у 3 (4 %) – меланома цилиарного тела, у 3 – меланома радужки и у 3 – меланома радужки с признаками поражения цилиарного тела или хориоидеи (смешанная). Важно отметить, что у 2 пациентов меланома хориоидеи была беспигментной.

Большинство пациентов с УМ составили женщины – 48/73 (66 %). Средний возраст постановки первичного диагноза УМ – 53 года (25–78 лет), при этом средний возраст мужчин – 52 года, женщин – 55 лет. Диагноз УМ был поставлен для 13 (18 %) пациентов в возрасте до 40 лет, для 15 (20 %) – в возрасте 41–50 лет и для 13 (18 %) – 51–60 лет. У 27 (37 %) больных появление опухоли отмечено в возрасте 61–70 лет и у 5 человек – старше 70 лет.

Большинство (62/73, 85 %) пациентов с УМ на момент проведения исследования имели метастазы, чаще всего в печени (>80 %), реже в легкие, кости, мягкие ткани головы, кожу. Среднее время появления метастазов после первичного лечения (хирургическая энуклеация, радиотерапия либо лазерное лечение) варьировало от нескольких месяцев до 18 лет.

Всего при генетическом анализе 73 УМ мутации *GNAQ* и *GNA11* выявлены в 81 % (59/73) случаев (табл. 2). Мутации в экзоне 5 гена *GNAQ* обнаружены в 42 % (31/73) случаев УМ: доминировали замены Q209P в 74 % (23/31), а Q209L выявлены в 26 % (8/31). Мутации в кодоне 209 гена *GNA11* обнаружены в 38,4 % (28/73) случаев, причем доминировали замены Q209L (26/28; 93 %), тогда как замены Q209P выявлены

Таблица 1. Клиническая характеристика больных uvealной меланомой (УМ) ($n = 73$)

Table 1. Clinical characteristics of the patients with uveal melanoma (UM) ($n = 73$)

| Характеристика Characteristic | <i>n</i> | % |
|---|----------|----|
| Пол: Sex: | | |
| женский female | 48 | 66 |
| мужской male | 25 | 34 |
| Возраст пациентов, лет: Patient age, years: | | |
| моложе 40 younger than 40 | 13 | 18 |
| 41–50 | 15 | 20 |
| 51–60 | 13 | 18 |
| 61–70 | 27 | 37 |
| старше 70 лет older than 70 | 5 | 7 |
| Локализация первичной УМ: Localization of primary UM: | | |
| хориоидея choroidea | 64 | 88 |
| цилиарное тело ciliary body | 3 | 4 |
| радужка iris | 3 | 4 |
| смешанная mixed | 3 | 4 |
| Гистологический вариант строения УМ: UM histological type: | | |
| веретенноклеточный spindle cell | 18 | 43 |
| эпителиоидноклеточный epithelioid cell | 15 | 36 |
| смешанный mixed | 9 | 11 |
| неизвестно unknown | 31 | – |
| Метастазирование УМ: UM metastases: | | |
| первичная меланома primary melanoma | 11 | 15 |
| метастатическая metastatic | 62 | 85 |

только в 7 % (2/28) УМ. Любопытно, что мутации в экзоне 4 *GNAQ* и *GNA11* в кодоне 183 не обнаружены, при этом выявлен 1 случай SNP в интроне 4.

Имеются различия в частоте мутаций *GNAQ* и *GNA11* в первичной и метастатической УМ. В первичной УМ мутации *GNAQ* выявлены в 7 (63 %), а *GNA11* – в 2 (18 %) из 11 случаев. Еще в одной первичной УМ обнаружена мутация *KIT* и в одной первичной УМ мутации не выявлены. Если же взять только случаи метастатической УМ, мутации *GNAQ* выявлены в 39 % (24/62), а *GNA11* – в 42 % (26/62) УМ. Частота мутаций *GNAQ* и *GNA11* не различалась в возрастных группах моложе и старше 50 лет.

Таблица 2. Результаты анализа мутаций в увеальной и конъюнктивной меланоме

Table 2. Results of mutation analysis in uveal and conjunctival melanoma

| Меланома глаза Melanoma of the eye | Число больных, n Number of patients, n | Мутации генов Gene mutations | | | | | |
|---------------------------------------|---|---------------------------------|--------------|------------|-------------|-------------|-----------|
| | | <i>GNAQ</i> | <i>GNA11</i> | <i>KIT</i> | <i>BRAF</i> | <i>NRAS</i> | <i>WT</i> |
| Увеальная: Uveal: | 73 | 31 | 28 | 3 | 2 | — | 9 |
| хориоидеи choroidea | 64 | 28 | 24 | 2 | 2 | — | 8 |
| цилиарного тела ciliary body | 3 | 1 | 2 | — | — | — | — |
| радужки iris | 3 | 1 | 1 | — | — | — | 1 |
| смешанная mixed | 3 | 1 | 1 | 1 | — | — | — |
| Конъюнктивная Conjunctival | 5 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 |

Примечание. *WT* — дикий тип тестируемых генов.

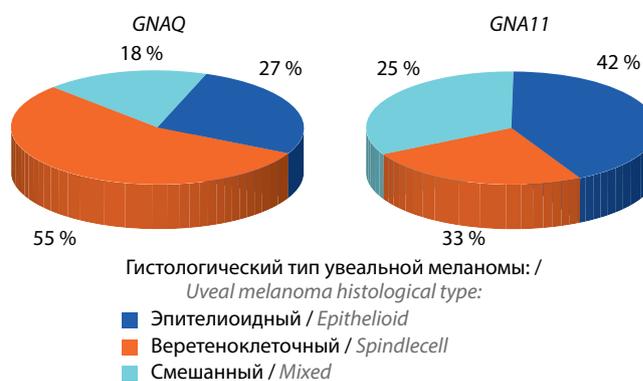
Note. *WT* — wild type of the tested genes.

При сравнении УМ разной локализации существенных различий в частоте мутаций онкогенов не обнаружено. Мутации *GNAQ* выявлены в 28 % случаев меланомы хориоидеи и в 33 % случаев меланомы цилиарного тела, радужки и смешанной УМ. Мутации *GNA11* обнаружены в 24 % случаев меланомы хориоидеи и в 33 % случаев меланомы радужки и смешанной УМ, а также в 2 (66 %) из 3 случаев меланомы цилиарного тела. Среди образцов меланомы радужки выявлены опухоли с мутациями *GNAQ*, *GNA11* или *KIT* и образцы с диким типом исследованных генов (см. табл. 2).

Мутации в экзоне 11 *KIT* выявлены в 3 случаях УМ у больных в возрасте до 50 лет: у 2 пациенток: в веретеночелючной (*del557-559WKV>C*) и эпителиоидной (*Q556H*) меланоме хориоидеи. У обеих пациенток метастазы развились соответственно через 6 и 7 лет, общая выживаемость составила 6 лет 4 мес и 9 лет соответственно. Кроме того, мутация в экзоне 11 гена *KIT* (*K558N*) выявлена у пациентки 38 лет в первичной меланоме радужки с начальными признаками инвазии цилиарного тела и склеры.

Мутации *BRAF* обнаружены в 2 случаях УМ: у пациентки 58 лет с разрастанием пигментной эпителиоидной меланомы хориоидеи задней стенки глазного яблока с прорастанием склеры и врастанием в прилежащие мягкие ткани (*BRAF V600E*). Мутация в экзоне 15 гена *BRAF* также обнаружена у пациента 56 лет с диссеминированной меланомой хориоидеи правого глаза с метастазами в печени при использовании ПЦП в реальном времени с плавлением, тогда как при использовании менее чувствительного метода секвенирования по Сэнгеру эта мутация не обнаружена. Во всех остальных случаях перепроверка данных секвенирования по Сэнгеру методом ПЦП с плавлением подтвердила полученные ранее результаты.

По гистологической картине случаи УМ разделяются на веретеночелючные (43 %), эпителиоидные (35 %) и со смешанным типом клеток (21 %). При сопоставлении УМ с различной гистологической картиной обнаружены различия в частоте мутаций *GNAQ* и *GNA11* (см. рисунок). Мутации *GNAQ* выявлены в 55 % случаев УМ с веретеночелючным фенотипом, в 27 % — с эпителиоидным и в 18 % — со смешанным фенотипом. Мутации *GNA11* чаще присутствовали в эпителиоидных (42 %), чем в веретеночелючных УМ (33 %) и в УМ со смешанным фенотипом (21 %). Таким образом, мутации *GNAQ* чаще присутствовали у пациентов с веретеночелючной УМ, а *GNA11* — с эпителиоидной УМ. Следует отметить, что, по данным литературы, последние характеризуются худшей выживаемостью [4]. Однако при анализе общей выживаемости пациентов с УМ в зависимости от наличия мутаций в генах *GNAQ* и *GNA11* достоверных различий нами не выявлено.



Частота мутаций генов *GNAQ* и *GNA11* в различных типах клеток увеальной меланомы (n = 42)

Mutation rates for the *GNAQ* and *GNA11* genes in various cell types of uveal melanoma (n = 42)

Меланома конъюнктивы. КМ обнаружена только у 5 пациентов (из них 4 женщины) в возрасте 33–68 лет (средний возраст 52,2 года). Средний возраст постановки диагноза – 42 года. У 1 пациентки 39 лет диагностирован рецидив КМ, причем первичная меланома была выявлена в возрасте 21 года. Другая пациентка 33 лет с метастазами КМ заболела в 31 год. У 3 пациентов обнаружены метастазы КМ в печени, у 1 пациента – в головном мозге. При генетическом анализе у 3 из 5 пациентов с КМ обнаружена мутация *BRAF V600E* (60 %), у 1 – *NRAS Q61K* (20 %). У 1 пациентки не удалось выявить ни одной из исследованных мутаций ни в первичной КМ, ни в метастазе в печени.

Обсуждение

УМ – наиболее распространенная опухоль глаза у взрослых, которая метастазирует более чем в 50 % случаев после удаления или лечения первичной опухоли, однако эффективного лечения этого заболевания сегодня нет [1–4, 21]. Установлено, что на ранних стадиях заболевания в 83 % случаев УМ возникают активирующие мутации в генах *GNAQ* и *GNA11*, которые играют важную роль в развитии УМ [8–10].

В настоящей работе проведен генетический анализ опухолевой ДНК у 73 пациентов с УМ (наиболее крупная выборка в России). Важно отметить более ранний возраст пациентов (средний возраст 53 года), преимущественно женщин, по сравнению с западными странами (>60–70 лет), где большинство больных – мужчины [22]. Профиль мутаций в целом соответствует данным литературы [8–10]. У половины пациентов с метастатической УМ мы исследовали биопсии метастазов в печени, а у остальных – первичные опухоли. У нас не было возможности сравнить мутации в первичной опухоли и метастазе пациентов с УМ, поэтому мы допускаем, что данные по первичной опухоли и метастазу совпадают. Как показали результаты специальных исследований, имеется 100 % совпадение в наличии мутаций *GNAQ* и *GNA11* в первичной опухоли и метастазе УМ [23].

Мутации *GNAQ/GNA11* нами выявлены в 81 % случаев УМ: в 83 % случаев первичной и в 80 % – метастатической УМ. Мутации *GNAQ* обнаружены в 63 % случаев первичной и в 39 % метастатической УМ, тогда как мутации *GNA11* – в 18 % первичной и в 42 % метастатической УМ. Частота мутаций *GNAQ* и *GNA11* не различалась в опухолях у пациентов моложе и старше 50 лет. Выявлены различия в частоте мутаций генов в зависимости от гистологического типа клеток: мутации *GNAQ* обнаружены в 55 % веретенчатых УМ, мутации *GNA11* чаще (42 %) выявлялись в эпителиоидных опухолях. По данным аналогичных исследований, эпителиоидный тип клеток является признаком неблагоприятного прогноза [2–4]. Однако при анализе общей выживаемости в зависимости от наличия мутации в генах *GNAQ* и *GNA11* достоверных различий в анализируемой выборке не наблюдалось. Кроме *GNAQ* и *GNA11* в 3 случаях УМ выявлены мутации *KIT*, в 2 – *BRAF*.

При сравнении УМ разной локализации существенных различий в частоте мутаций онкогенов при меланоме хориоидеи, цилиарного тела и радужки не обнаружено, хотя некоторые авторы утверждают, что в меланоме цилиарного тела не встречается мутация *GNAQ* [22]. В нашем исследовании в 2 меланоме цилиарного тела выявлена мутация *GNA11*, и в 1 – *GNAQ*. Таким образом, мутация *GNA11* обнаружена в 66 % случаев меланомы цилиарного тела, что коррелирует с данными о высокой экспрессии *GNA11* в меланоме цилиарного тела и плохом прогнозе этого варианта УМ [14], однако выборка этого типа меланом у нас недостаточна для подобных выводов.

Мутации *GNAQ* встречались чаще в первичной, а *GNA11* – в метастатической УМ, что подтверждает данные литературы. Так, мутации *GNAQ* выявлены в 45–50 % случаев первичной УМ, в 22 % метастатической УМ [9], а мутации *GNA11* найдены в 32 % случаев первичной УМ и в 57 % метастатической УМ [10]. Поскольку мутации *GNA11* встречались в метастатической УМ чаще, чем *GNAQ*, и наличие мутации коррелировало с выживанием пациентов, авторы сделали вывод о том, что мутации *GNA11* имеют прогностическое значение, такие опухоли ассоциированы с высоким риском метастазирования и худшим прогнозом, чем меланома с мутацией *GNAQ* [13]. По другим данным, общая выживаемость пациентов с УМ хуже при наличии мутации *GNAQ* [24]. Последующие исследования показали, что гены *GNAQ* и *GNA11* не имеют существенного прогностического значения для пациентов с УМ, тогда как существует группа генов *BSE* (*BAP1*, *SF3B1* и *EIF1AX*), мутации в которых несут риск метастазирования УМ и имеют прогностическое значение [2, 20].

По разным данным, частота мутаций генов *GNAQ* и *GNA11* в УМ достигает в популяции европеоидов 64,4–88,0 % [22, 24]. Фактически Gq-сигнальный путь активирован в 100 % случаев УМ, его активация является иницирующей для УМ, необходима, но недостаточна для трансформации клеток [26], аналогично тому, как для образования меланомы кожи недостаточно мутации *BRAF*. Недавно в УМ, не содержащей мутации *GNA11* и *GNAQ*, обнаружены инактивирующие мутации других генов Gq-сигнального пути: *CYSLTR2* и *PLCB4* [25, 26]. После того как *CYSLTR2* активирует белки Ga/q11, происходит обмен ГДФ на ГТФ, что приводит к связыванию Ga/q11 с фосфолипазой C β и к активации PLC β -пути с последовательным высвобождением ионов Ca. Мутантные *GNAQ* и *GNA11* через протеинкиназу C могут активировать MAP-киназный путь [20]. В связи с этим в течение ряда лет проводились исследования по использованию ингибиторов MEK – селуметиниба и траметиниба – для лечения УМ [1, 21], однако надежды на использование этих препаратов таргетной терапии не оправдались. Хотя в 95 % метастазов УМ экспрессируется рецептор KIT, известно, что ингибиторы тирозинкиназ эффективны

только в клетках с мутантным *KIT*. Тем не менее попытки лечения УМ с мутациями *KIT* ингибиторами тирозинкиназ (иматиниб, сунитиниб) также не увенчались успехом, так как эффект был слишком краткосрочным [27, 28].

Любопытно, что активирующие соматические мутации генов *GNAQ/GNA11* затрагивают кодон Q209 экзона 5 (замены глутамина на лейцин Q209L – 51 % или пролин Q209P – 47 %) [9, 10, 13]. В нашем исследовании в гене *GNAQ* доминировала мутация Q209P (74 %), а в гене *GNA11* – Q209L (93 %), и общее число замен в *GNAQ/GNA11* Q209L (34/59; 58 %) значительно превышает число замен Q209P (25/59; 42 %). В связи с этим мы обратили внимание не только что появившееся пилотное сообщение американских исследователей, согласно которому при лечении больных УМ с метастазами в печени паклитаксолом обнаружены различия в реакции на лечение в зависимости от типа мутации *GNAQ* [29]. Ответ на лечение отмечен у пациента с метастазом УМ в печени и мутацией *GNAQ* Q209P, но не у 2 других пациентов с мутацией *GNAQ* Q209L или пациента с мутацией *KIT*. Можно предположить, что, поскольку пролин существенно изменяет угол аминокислотной цепи (на 120°), замена может влиять на свойства белка GNAQ. Хотя это только первое единичное наблюдение и оно требует дальнейшего подтверждения, авторы полагают, что мутация *GNAQ* Q209P может быть предиктивным маркером чувствительности метастатической УМ к паклитакселу и другим таксанам [29]. Кстати, в нашей работе практически все замены глутамина на пролин выявлены в гене *GNAQ*.

Особый интерес представляет изучение группы пациентов с редкой КМ, которая отличалась ранним средним возрастом возникновения опухоли (42 года). Так, у 2 пациенток опухоли возникли в 21 и 31 год. Четыре из 5 пациентов были женщины, средний возраст – 52 года. Метастазы (в печени, головном мозге) обнаружены у всех, за исключением пациентки с рецидивом КМ. Профиль мутаций онкогенов соответствовал другим опубликованным данным: в 3 (60 %) КМ выявлена мутация *BRAF V600E*, а в 1 (20 %) – *NRAS Q61K* [17, 30]. У 1 пациентки мутации отсутствовали как в первичной КМ, так и в метастазе в печени. По данным литературы, в таких случаях может иметь место активация MAP-киназного пути за счет мутации *NFI* [30]. Интересно, что для КМ не характерны мутации *KIT*. Есть основания полагать, что пациентам с КМ может помочь комбинированная таргетная терапия ингибиторами *BRAF* и *MEK* [31].

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о молекулярной гетерогенности меланомы глаза. Несомненно, что всем пациентам с УМ или КМ необходимо проводить генетические исследования для характеристики процесса и выбора терапии. Уже сегодня выявление мутаций *BRAF* или *KIT* позволяет надеяться на возможность применения соответствующей таргетной терапии. Мутации *GNAQ/GNA11* не имеют существенного прогностического значения, но, возможно, могут иметь предиктивное значение, например по чувствительности к таксанам. Надеемся, что дальнейшие исследования дадут ответ на этот вопрос.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мазуренко Н.Н. Молекулярно-генетические факторы и маркеры меланомы. В кн.: Молекулярно-генетические маркеры опухолей. Ред.: Н.Е. Кушлинский, Н.Н. Мазуренко, М.В. Немцова. М.: РАМН, 2016. Pp. 85–128. [Mazurenko N.N. Molecular and genetic factors and markers of melanoma. In: Molecular and genetic tumor markers. Eds.: N.E. Kushlinsky, N.N. Mazurenko, M.V. Nemtsov. Moscow: RAMN, 2016. P. 85–128. (In Russ.)].
2. Helgadóttir H., Höiom V. The genetics of uveal melanoma: current insights. *Appl Clin Genet* 2016;9:147–55. DOI: 10.2147/TACG.S69210. PMID: 27660484.
3. Jovanovic P., Mihajlovic M., Djordjevic-Jocic J. et al. Ocular melanoma: an overview of the current status. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(7):1230–44. PMID: 23826405.
4. Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011;118(9):1881–5. DOI: 10.1016/j.jophtha.2011.01.040. PMID: 21704381.
5. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch Ophthalmol* 2001;119(5):670–6. DOI: 10.1001/archophth.119.5.670.
6. Coupland S.E., Lake S.L., Zeschnigg M., Damato B.E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)* 2013;27(2):230–42. DOI: 10.1038/eye.2012.255. PMID: 23222563.
7. Wallander M.L., Layfield L.J., Emerson L.L. et al. *KIT* mutations in ocular melanoma: frequency and anatomic distribution. *Mod Pathol* 2011;24(8):1031–5. DOI: 10.1038/modpathol.2011.57. PMID: 21478825.
8. Onken M.D., Worley L.A., Long M.D. et al. Oncogenic mutations in *GNAQ* occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(12):5230–4. DOI: 10.1167/iiov.08-2145. PMID: 18719078.
9. Van Raamsdonk C.D., Bezrookove V., Green G. et al. Frequent somatic mutations of *GNAQ* in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009;457(7229):599–602. DOI: 10.1038/nature07586. PMID: 19078957.
10. Van Raamsdonk C.D., Griewank K.G., Crosby M.B. et al. Mutations in *GNA11* in uveal melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(23):2191–9. DOI: 10.1056/NEJMoa1000584. PMID: 21083380.
11. Gaudi S., Messina J.L. Molecular bases of cutaneous and uveal melanomas. *Pathol Res Int* 2011;2011:159421. DOI: 10.4061/2011/159421. PMID: 21876842.
12. Hawkes J.E., Campbell J., Garvin D. et al. Lack of *GNAQ* and *GNA11* germ-line mutations in familial melanoma pedigrees with uveal melanoma or blue nevi. *Front Oncol* 2013;3:160.

- DOI: 10.3389/fonc.2013.00160.
PMID: 23825798.
13. Griewank K.G., van de Nes J., Schilling B. et al. Genetic and clinicopathologic analysis of metastatic uveal melanoma. *Mod Pathol* 2014;27(2):175–83. DOI: 10.1038/modpathol.2013.138. PMID: 23887304.
 14. Scholz S.L., Möller I., Reis H. et al. Frequent GNAQ, GNA11, and EIF1AX mutations in iris melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(9):3464–70. DOI: 10.1167/iovs.17–21838. PMID: 28700778.
 15. van Poppelen N.M., Vaarwater J., Mudhar H.S. et al. Genetic background of iris melanomas and iris melanocytic tumors of uncertain malignant potential. *Ophthalmology* 2018;125(6):904–12. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.12.022. PMID: 29371009.
 16. Wong J.R., Nanji A.A., Galor A., Karp C.L. Management of conjunctival malignant melanoma: a review and update. *Expert Rev Ophthalmol* 2014;9(3):185–204. DOI: 10.1586/17469899.2014.921119. PMID: 25580155.
 17. Griewank K.G., Westkemper H., Murali R. et al. Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas. *Clin Cancer Res* 2013;19(12):3143–52. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0163. PMID: 23633454.
 18. Ковчина К.И., Беляков И.С., Лихванцева В.Г. и др. Мутации в генах KIT, GNAQ, BRAF и RAS у больных увеальной меланомой. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2011;(3):48–52. [Kovchina K.I., Belyakov I.S., Likhvantseva V.G. et al. KIT, GNAQ, BRAF and RAS oncogene mutations in patients with uveal cancer. *Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Bone and Soft Tissue Sarcomas, Tumors of the Skin* 2011;(3):48–52. (In Russ.)].
 19. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Lushnikova A.A. et al. Spectrum of oncogene mutations is different in melanoma subtypes. *Mol Biol (Mosk)* 2015;49(6):1022–9. DOI: 10.7868/S0026898415060166. PMID: 26710785.
 20. Decatur C.L., Ong E., Garg N. et al. Driver mutations in uveal melanoma: associations with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmol* 2016;134(7):728–33. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0903. PMID: 27123562.
 21. Lee S.H., Kim J.E., Jang H.S. et al. Genetic alterations among Korean melanoma patients showing tumor heterogeneity: a comparison between primary tumors and corresponding metastatic lesions. *Cancer Res Treat* 2018. DOI: 10.4143/crt.2017.535. PMID: 29361821.
 22. Schneider B., Riedel K., Zhivov A. et al. Frequent and Yet Unreported GNAQ and GNA11 Mutations are Found in Uveal Melanomas. *Pathol Oncol Res* 2017. DOI: 10.1007/s12253-017-0371-7. PMID: 29209985.
 23. Field M.G., Michael A., Durante M.A. et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun* 2018;9(1):116. DOI: 10.1038/s41467-017-02428-w. PMID: 29317634.
 24. Chua V., Aplin A.E. Novel therapeutic strategies and targets in advanced uveal melanoma. *Curr Opin Oncol* 2018;30(2):134–41. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000425. PMID: 29206651.
 25. Moore A.R., Ceraudo E., Sher J.J. et al. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor *CYSLTR2* in uveal melanoma. *Nat Genet* 2016;48(6):675–80. DOI: 10.1038/ng.3549. PMID: 27089179.
 26. Field M.G., Durante M.A., Anbunathan H. et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun* 2018;9(1):116. DOI: 10.1038/s41467-017-02428-w. PMID: 29317634.
 27. Mahipal A., Tjani L., Chan K. et al. A pilot study of sunitinib malate in patients with metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res* 2012;22(6):440–6. DOI: 10.1097/CMR.0b013e328358b373. PMID: 23114504.
 28. Maio M., Danielli R., Chiarion-Sileni V. et al. Efficacy and safety of ipilimumab in patients with pre-treated, uveal melanoma. *Ann Oncol* 2013;24(11):2911–5. DOI: 10.1093/annonc/mdt376. PMID: 24067719.
 29. Abdel Karim N., Eldessouki I., Taftaf A. et al. GNQ-209P Mutation in metastatic uveal melanoma and treatment outcome. *Case Rep Oncol Med* 2018;2018:4256365. DOI: 10.1155/2018/4256365. PMID: 29850322.
 30. Scholz S.L., Cosgarea I., Süßkind D. et al. NF1 mutations in conjunctival melanoma. *Br J Cancer* 2018;118(9):1243–7. DOI: 10.1038/s41416-018-0046-5. PMID: 29559732.
 31. Mor J.M., Heindl L.M. Systemic BRAF/MEK inhibitors as a potential treatment option in metastatic conjunctival melanoma. *Ocul Oncol Pathol* 2017;3(2):133–41. DOI: 10.1159/000452473. PMID: 28868285.

Вклад авторов

Н.Н. Мазуренко: дизайн исследования, анализ результатов, написание статьи;
И.В. Цыганова, Д.А. Понкратова: получение результатов исследования;
В.В. Назарова: сбор и обработка материала, анализ результатов;
И.А. Утяшев, К.В. Орлова: сбор материала;
Д.А. Мартынков: получение материала;
Л.В. Демидов: концепция исследования.

Authors' contributions

N.N. Mazurenko: developing the research design, analysis of the data, article writing;
I.V. Tsyganova, D.A. Ponkratova: study results generation;
V.V. Nazarova: material collection and processing, analysis of the data;
I.A. Utyashev, K.V. Orlova: material collection;
D.V. Martinkov: receipt material;
L.V. Demidov: study concept.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.Н. Мазуренко/N.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0003-4767-6983>
В.В. Назарова/V.V. Nazarova: <https://orcid.org/0000-0003-0532-6061>
И.А. Утяшев/I.A. Utyashev: <https://orcid.org/0000-0003-3474-5273>

К.А. Орлова/K.V. Orlova: <https://orcid.org/0000-0002-0442-5917>

Д.А. Понкратова/D.A. Ponkratova: <https://orcid.org/0000-0002-9048-4410>

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

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

Статья поступила: 20.07.2018. **Принята к публикации:** 14.08.2018.

Article received: 20.07.2018. **Accepted for publication:** 14.08.2018.

Цитотоксичные катионные пептиды как лиганды рецепторного нуклеолина

А.А. Лушникова¹, А.В. Костарев², Д.А. Понкратова¹, А.В. Онян¹, Е.Г. Глубокова¹, С.М. Андреев³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ломоносовский проспект, 27;

³ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Александровна Лушникова LAN21@yandex.ru

Введение. Шаперонные белки нуклеолин (NCL, или C23) и нуклеофозмин (NPM, или B23) регулируют ключевые клеточные функции. Для большинства опухолей характерна гиперэкспрессия этих белков, особенно в клеточных ядрах, а рецепторного NCL – также и на поверхности опухолевых клеток. Дифференциальная экспрессия NCL/NPM в опухолевых и нормальных клетках обуславливает избирательную цитотоксичность катионных пептидов – предполагаемых лигандов этих белков.

Цель исследования – анализ взаимодействий между нуклеолином и некоторыми пептидами, обладающими высокой избирательной токсичностью в отношении опухолевых клеток.

Материалы и методы. Путем парного молекулярного докинга с использованием программы Maestro 11 проанализировано взаимодействие 4 ранее охарактеризованных катионных пептидов с димером нуклеолина.

Результаты и заключение. Показано, что эти пептиды могут ассоциировать с молекулами рецепторного нуклеолина за счет стабильных водородных связей, образуя энергетически устойчивые комплексы. В активном центре рецепторного NCL обнаружено не менее 7 аминокислотных сайтов, которые с высокой частотой (43–100 %) связываются с тестированными пептидами. Это указывает на консервативность структуры димерного NCL, стабильное связывание его с пептидными лигандами и возможность синтеза оптимальных по молекулярной структуре катионных пептидов, индуцирующих гибель опухолевых клеток за счет конкурирующего связывания с белками-мишенями.

Ключевые слова: злокачественная опухоль, нуклеолин, катионные пептиды, молекулярный докинг

Для цитирования: Лушникова А.А., Костарев А.В., Понкратова Д.А. и др. Цитотоксичные катионные пептиды как лиганды рецепторного нуклеолина. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):59–64.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-59-64

Cytotoxic cationic peptides as a ligands for receptor nucleolin

A.A. Lushnikova¹, A.V. Kostarev², D.A. Ponkratova¹, A.V. Onyan¹, E.G. Glubokova¹, S.M. Andreev³

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 27 Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³Immunology Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia; 24, Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Chaperone proteins nucleolin (NCL, or C23) and nucleophosmin (NPM, or B23) regulate key cell functions. The most tumors are characterized by over-expression of these proteins, especially in cell nuclei and on the cell surface, as NCL. Differential expression of NCL/NPM in tumor and normal cells is the basis of selective cytotoxicity of cationic peptides – expected ligands for these proteins.

Objective. Analysis of the interactions between nucleolin and some peptides with high nonspecific toxicity for tumor cells.

Materials and methods. The interaction of 4 previously characterized cationic peptides with nucleolin dimer was analyzed by pair molecular docking using Maestro 11 program.

Results and conclusion. It is shown that these peptides can associate with receptor nucleolin molecules, forming energy-stable complexes. In the active centre of NCL molecule were found, at least, 7 positions of amino acids, which bind to the tested peptides at a high frequency (43–100 %). This indicates the conservative structure of dimer NCL, its stable binding to peptide ligands and the possibility of design the optimal structure of cationic peptides that induce tumor cell death due to competing binding to the target proteins.

Key words: malignant tumor, nucleolin, cationic peptide, molecular docking

For citation: Lushnikova A.A., Kostarev A.V., Ponkratova D.A. et al. Cytotoxic cationic peptides as a ligands for receptor nucleolin. Uspехи molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(3):59–64.

Введение

Шаперонные белки нуклеолин (NCL, или C23) и нуклеофозмин (NPM, или B23) – мультифункциональные протеины, регулирующие транскрипцию и трансляцию, синтез РНК, сборку хроматина и веретена деления, биогенез рибосом и другие жизненно важные клеточные процессы. Они контролируют клеточную пролиферацию, апоптоз, молекулярный транспорт и сигналинг. Для этих белков характерен высокий уровень экспрессии в быстрорастущих опухолевых клетках, преимущественно в ядрах, а нуклеолина – также и на клеточной поверхности. Представленные на мембране клеток в гликозилированной или фосфорилированной форме молекулы нуклеолина участвуют в интернализации различных лигандов, включая синтетические агенты для противоопухолевой терапии [1, 2].

Ранее мы обнаружили, что ряд низкомолекулярных катионных пептидов, обогащенных аргинином и лизином (R/K), с линейной или дендритной структурой обладает избирательной токсичностью *in vitro* в отношении клеток меланомы кожи человека, рака поджелудочной железы, глиобластомы, рака яичников, доксорубицин-устойчивой опухоли молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы и гепатобластомы, светлоклеточного рака почки, множественной миеломы [3]. Эти пептиды малотоксичны для нормальных клеток, устойчивы к биодеградации и представляют интерес для дальнейшего изучения.

На модельных клеточных линиях меланомы *mel IS*, *mel H*, *mel Ki*, рака почки, глиобластомы *Glb* и некоторых других выявлена дифференциальная гиперэкспрессия NCL/NPM по отношению к морфологически нормальным клеткам [4]. Скрининг коллекции катионных пептидов с помощью МТТ-теста позволил охарактеризовать 7 пептидов с высокой избирательной цитотоксичностью. Показано, что флуоресцентно меченный цианином пептид *Su5-NC811* проникает в клетки и колокализуется в ядре вместе с молекулами нуклеолина и нуклеофозмина, что указывает на участие в его транспорте белков NCL и NPM [5]. Однако механизм связывания рецепторного нуклеолина с ка-

тионными пептидами остается невыясненным. Анализ взаимодействия некоторых катионных пептидов с их предполагаемой мишенью – рецепторным нуклеолином – возможен с помощью молекулярного докинга (стыковки), позволяющего выявить сайты взаимодействия лигандов с белком-мишенью и получить оптимальную пространственную структуру комплекса пептид – нуклеолин, а также определить тип межмолекулярного связывания для дизайна катионных пептидов, перспективных в плане малотоксичной молекулярно направленной противоопухолевой терапии.

Материалы и методы

В качестве предполагаемых лигандов молекул рецепторного NCL отобраны 4 катионных пептида, характеристики которых приведены в табл. 1.

В качестве эталонного белка-мишени выбрана кристаллическая структура нуклеолина, полученная путем магнитно-резонансной спектроскопии, включающая 1 цепь, 102 аминокислотных остатка (PDB, Protein Data Bank 2FC8), с учетом димеризации рецепторного нуклеолина. Моделирование межмолекулярных взаимодействий выполнено с помощью программы Maestro 11 [6]. Предварительная подготовка заключалась в протонировании (pH 7,0) белка и однократной минимизации структуры по силовому полю OPLS3 во избежание деформации трехмерной структуры белка. Поскольку сайты связывания между молекулами пептида и нуклеолина пока не картированы, для выбора области связывания использовали докинг-бокс максимального объема с ребром, равным 36Å, захватывающий весь белок. Сетку потенциалов с использованием максимальных значений оценочной функции (glide score) вычисляли для всей молекулы белка. В молекуле каждого из 4 тестируемых пептидов были выделены фрагменты, обогащенные зараженными аминокислотами. В результате для каждого предварительно протонированного (pH 7,0) лиганда получено по 4 пространственных конформера с 4 конфигурациями (позами), для которых просчитаны значения оценочной функции.

Таблица 1. Основные свойства тестируемых катионных пептидов

Table 1. Main characteristics of the tested cationic peptides

| Номер Number | Название и формула катионного пептида Name and formula of the cationic peptide | Молекулярная масса, Да/заряд Molecular mass, Da/charge | Эффективная концентрация, мкг/мл Effective concentration, µg/mL | Процент выживших клеток в разных линиях, МТТ-тест vs контроль (100 %), C = 1 мкг/мл Percent of survived cells in various lines, MTT assay vs control (100 %), C = 1 µg/mL |
|-----------------|---|---|--|--|
| 1 | NC-811/(R) ₈ (K) ₄ (K)2KAC-NH ₂ | 2338/16+ | ≥0,75 | 8–10 |
| 2 | NC-810/Palm-CKRRRRRRRRRR | 2307/12+ | ≥0,25 | 12–23 |
| 3 | NC-783/KRRGGGKLLKLLKLLKLLK | 2505/9+ | ≥0,25 | 8–12 |
| 4 | AM-2/Mir-KRPARPAR-NH ₂ | 1391/4+ | ≥0,50 | 6–9 |

Для молекулярного докинга использовали описанную ранее процедуру поиска в молекуле белка сайтов связывания для тестируемых лигандов [7, 8]. Сайты связывания лигандов с нуклеолином и последующее позиционирование лиганда выполняли с учетом максимального значения оценочной функции. При моделировании процесса докинга вычисляются попарные энергии взаимодействия в сайтах связывания мишени и лиганда [9]. Анализировали средние частоты связывания аминокислот в активном центре рецепторного нуклеолина с лигандами и энергию связей (ккал/моль).

Результаты и обсуждение

Анализ попарного связывания нуклеолина (белок-мишень) с катионными пептидами (лиганды) показал, что большинство пептидных фрагментов связывается с активным центром нуклеолина со значениями оценочной функции $>6,50$ по модулю. Водородные связи между аминокислотами в составе нуклеоина и пептидного лиганда формируются не случайным образом. В 5 позициях аминокислот активного центра NCL средняя частота формирования водородных связей превысила 70 %, аспарагиновая кислота в позиции 87 связывалась со всеми фрагментами пептидов – тестируемых лигандов NCL (табл. 2). Отметим, что аргинин и лизин, представленные в составе всех тестируемых пептидов в виде повторов, также взаимодействуют с активным центром нуклеолина.

Для подтверждения этого наблюдения аминокислоты, с которыми пептидные лиганды связывались наиболее часто, использовали для процедуры Induced fit-докинга [10].

Программа произвольно изменяла подвижность и пространственную ориентацию лидерных аминокислот, докинг-бокс с ребром 26Å был центрирован на

Таблица 2. Средние частоты образования водородных связей между пептидными лигандами-лидерами и активным центром нуклеолина
Table 2. Mean frequencies of hydrogen bond formation between leader peptide ligands and nucleolin active site

| Аминокислота в молекуле нуклеолина, позиция Amino acid in nucleolin molecule, position | Частота связей с лигандом, % Frequency of ligand binding, % |
|---|--|
| GLU29 | 71 |
| ARG43 | 71 |
| THR46 | 43 |
| ASP60 | 71 |
| ASP87 | 100 |
| ALA89 | 29 |
| LYS90 | 71 |
| PRO91 | 29 |

конкретную область с анализируемой аминокислотой. Однако оценочные функции при Induced fit-докинге оказались близки к модульным значениям, полученным в режиме докинга, за исключением NC-810-1_1 с преобладанием аргинина/R (рис. 1).

Эти данные свидетельствуют об относительной стабильности структуры сайтов связывания белок – лиганд в активном центре нуклеолина, что отражает консервативную структуру NCL в целом. Действительно, нуклеолин – один из наиболее функционально важных для клетки белков – эволюционно консервативен. По-видимому, указанные аминокислоты играют ключевую роль во взаимодействии лигандов с димером нуклеолина путем образования стабильных водородных связей, и эти аминокислотные остатки можно

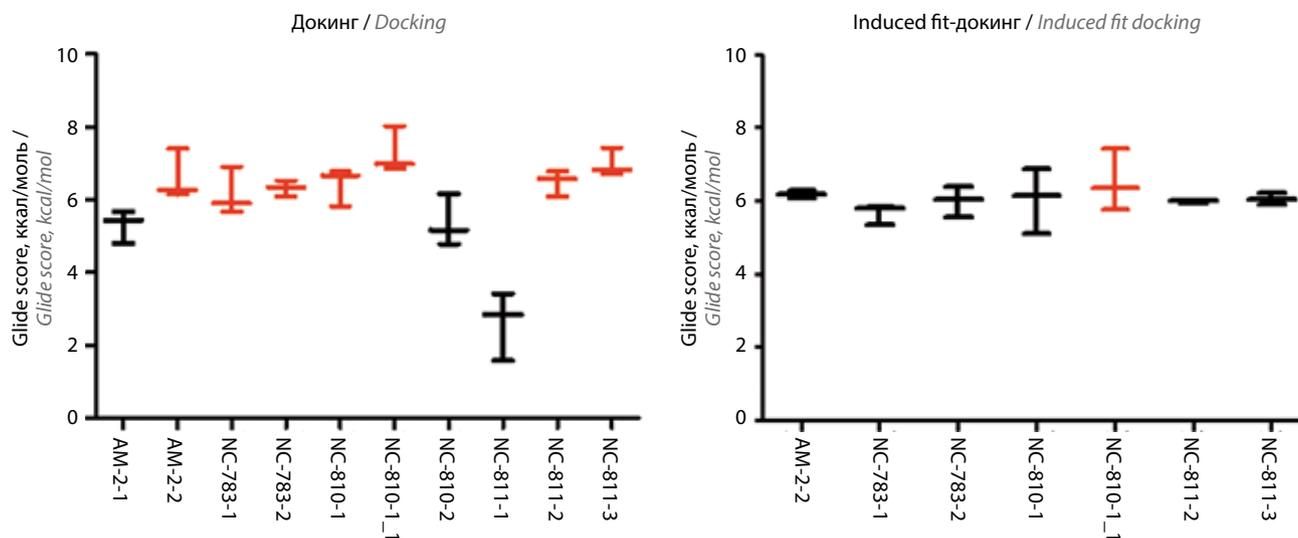


Рис. 1. Результаты докинга и Induced fit-докинга с фрагментами 4 катионных пептидов (ось абсцисс). Указаны модули средних значений функции (ось ординат). Красным выделены лиганды с максимальными значениями оценочной функции (glide score)

Fig. 1. Docking and Induced Fit docking results for 4 fragments of cationic peptides (X axis). Modules of mean function values are indicated (Y axis). Ligands with maximal glide scores are shown in red

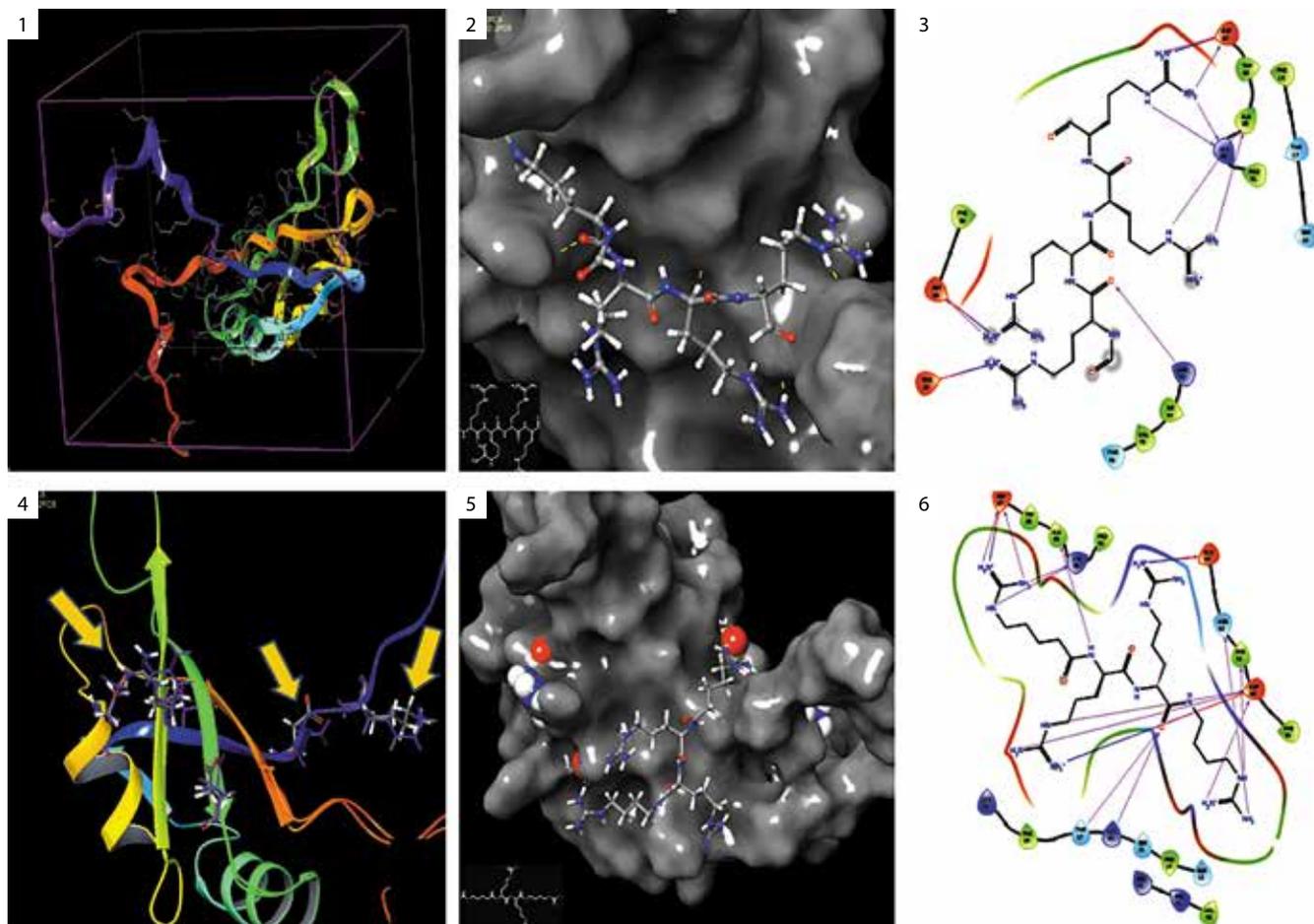


Рис. 2. Молекулярный докинг фрагментов пептида NC-810 и белка нуклеолина: 1 – подготовленная трехмерная структура нуклеолина 2FC8 (протонирование, минимизация) в докинг-боксе с ребром 36Å; 2 – позиционированный фрагмент пептида NC-810_1, оценочная функция 6,79 ккал/моль; 3 – схема взаимодействия лиганда с сайтами связывания NCL (п. 2); фиолетовым отмечены водородные связи; 4 – белок с подвижными аминокислотами (Induced fit): видны спиральные вторичные структуры белка; фиолетовым отмечены позиции аминокислот в исходной структуре нуклеолина, желтыми стрелками показан сдвиг аминокислот; 5 – Induced fit-докинг фрагмента пептида NC-810_1_16, оценочная функция 7,43 ккал/моль; красным выделены подвижные аминокислоты; 6 – схема взаимодействия лиганда с сайтами NCL (п. 5); фиолетовым отмечены водородные связи

Fig. 2. Molecular docking of NC-810 peptide fragments and nucleolin: 1 – prepared 3D structure of nucleolin 2FC8 (protonation, minimization) in a docking box with 36Å edge; 2 – positioned fragment of peptide NC-810_1, glide score 6.79 kcal/mol; 3 – ligand interaction scheme for NCL binding sites (n. 2); hydrogen bonds are shown in violet; 4 – protein with mobile amino acids (Induced Fit): spiral secondary protein structure is visible; amino acid positions in the initial nucleolin structure are shown in violet, yellow arrows indicate shifts of amino acids; 5 – Induced Fit docking of peptide NC-810_1_16 fragment, glide score 7.43 kcal/mol; mobile amino acids are shown in red; 6 – ligand interaction with NCL sites (n. 5); hydrogen bonds are shown in violet

считать неспецифичными сайтами связывания с высокими значениями оценочной функции.

Взаимодействие катионных пептидов с активным центром нуклеолина моделировали путем молекулярного докинга пептидных фрагментов и сайтов связывания, локализованных программой в активном центре белка (рис. 2). Аналогичным образом проанализированы закономерности связывания рецепторного нуклеолина с 3 другими катионными пептидами – AM-2, NC-783 и NC-811 (рис. 3).

В последнее время рецепторный нуклеолин, гиперэкспрессированный на поверхности опухолевых клеток, рассматривают в качестве удобной мишени для получения трехмерного изображения опухолей неинвазивным методом с использованием флуоресцентно меченных лигандов NCL или конструкций с мечены-

ми антителами к NCL, например псевдопептидов. Эти конструкции используются также для прицельной доставки в опухолевые клетки терапевтических препаратов [11, 12]. Некоторые катионные пептиды, индуцирующие апоптоз опухолевых клеток в концентрации порядка 0,5 мкл/мл, представляют не меньший интерес как потенциальные малотоксичные таргетные препараты широкого спектра действия. С помощью молекулярного докинга нам удалось показать, что в основе такой активности пептидов с R/K-обогащенной структурой молекулы лежит связывание их с активным центром рецепторного нуклеолина, что создает предпосылки для активного транспорта пептида в опухолевые клетки и быстрое накопление его в ядре с последующим апоптозом [5]. При этом в формировании сайтов связывания участвует определенный набор

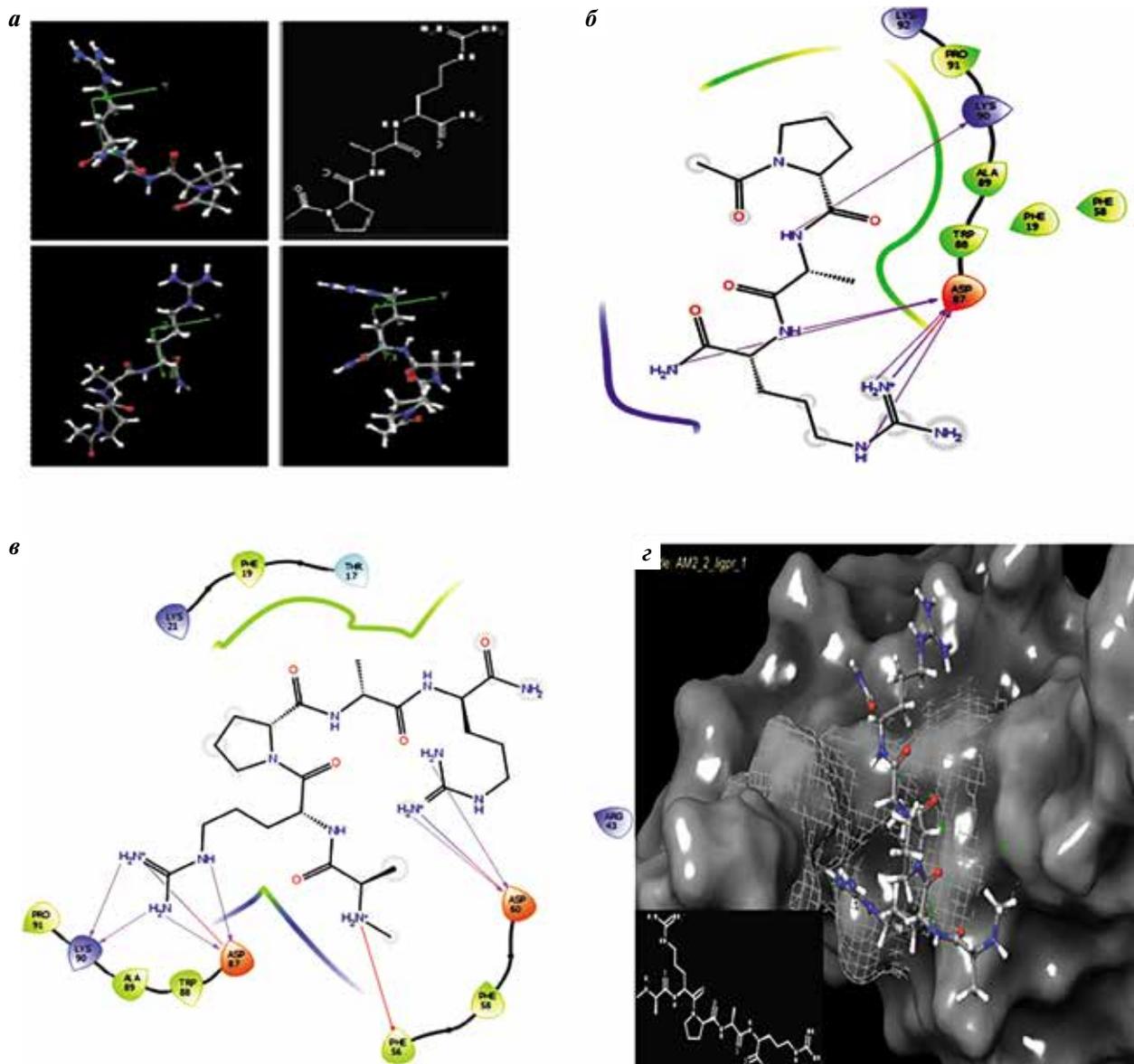


Рис. 3. Изомеризация фрагментов пептида AM-2 (а) и результаты моделирования их взаимодействия с активным центром NCL. Показаны наиболее стабильные сайты связывания — Asp87, Lys90 (б) и Phe56, Asp60, Asp87, Lys90 (в) в домене димера NCL и оптимальная ориентация кластера AM-2 (врезка внизу) в координатной сетке (г)

Fig. 3. AM-2 peptide fragment isomerization (a) and modeling results for their interaction with NCL active site. The most stable binding sites: Asp87, Lys90 (b) and Phe56, Asp60, Asp87, Lys90 (c) in NCL dimer domain and optimal orientation of AM-2 cluster (lower panel) in the coordinate grid (d) are shown

аминокислот со стабильной позицией и высокими значениями оценочной функции.

Заключение

Тестированные с помощью молекулярного докинга катионные пептиды можно рассматривать как лиганды NCL, а высокоэкспрессированный на поверхности

опухолевых клеток рецепторный нуклеолин — как их мишень. На основании максимальных значений оценочной функции для сайтов связывания стабильного активного центра NCL возможно моделирование оптимальных по структуре пептидных лигандов с избирательной цитотоксичностью в отношении опухолей, для которых характерен высокий профиль экспрессии нуклеолина.

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

1. Fujiki H., Watanabe T., Suganuma M. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140(7):689–99. DOI: 10.1007/s00432-014-1587-5. PMID: 24469254.
2. Koutsoumpa M., Papadimitriou E. Cell-surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. *Recent Part Anticancer Drug Discov* 2018;9(2):137–52. PMID: 24251811.
3. Lushnikova A., Ponkratova D., Andreev S. et al. A possibility for therapy of metastatic cutaneous melanoma with cationic peptides. *Eur J Cancer* 2017;72(SI): 127–28.
4. Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Rudakova A.A. et al. The mechanisms of antitumor toxicity in a number of cationic peptides. *Modern Science* 2017;11:124–6.
5. Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Morozova L.F., Andreev S.M. Induction of apoptosis in cutaneous melanoma cells by cationic peptides. *Int Sci J* 2017;7–2(61):75–9.
6. Dang W., Muto Y., Inoue Y. et al. RCSB PDB TI Solution structure of the RRM_1 domain of NCL protein. *FAUCRDT* 2005;12(12). Available at: <http://www.rcsb.org/structure/2FC8>.
7. Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins* 2004;57(2):225–42. DOI: 10.1002/prot.20149. PMID: 15340911.
8. Site Map User Manual. Schrödinger: LLC. Schrödinger Press, 2009.
9. Glide User Manual. Schrödinger: LLC. Schrödinger Press, 2015.
10. Induced Fit Docking. Schrödinger: LLC. Schrödinger Press, 2009.
11. Du X., Li Y., Xia Y.L. et al. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):144–78. DOI: 10.3390/ijms17020144. PMID: 26821017.
12. Balça-Silva J., do Carmo A., Tão H. et al. Nucleolin is expressed in patient-derived samples and glioblastoma cells, enabling improved intracellular drug delivery and cytotoxicity. *Exp Cell Res* 2018;370(1): 68–77. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.06.005. PMID: 29902537.

Вклад авторов

А.А. Лушникова: дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 А.В. Костарев: биоинформационный анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;
 Д.А. Понкратова: получение данных и их анализ;
 А.В. Онян, Е.Г. Глубокова, С.М. Андреев: получение данных для анализа.

Authors' contributions

A.A. Lushnikova: research design, analysis of the obtained data, article writing;
 A.V. Kostarev: bioinformation analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme;
 D.A. Ponkratova: obtaining data and analysis;
 A.V. Onyan, E.G. Glubokova, S.M. Andreev: obtaining data and analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.А. Лушникова/A.A. Lushnikova: <https://orcid.org/0000-0002-7838-1005>
 А.В. Костарев/A.V. Kostarev: <https://orcid.org/0000-0001-8040-5929>
 Д.А. Понкратова/D.A. Ponkratova: <https://orcid.org/0000-0002-1624-7556>
 А.В. Онян/A.V. Onyan: <https://orcid.org/0000-0003-0217-2685>
 Е.Г. Глубокова/E.G. Glubokova: <https://orcid.org/0000-0002-1206-287X>
 С.М. Андреев/S.M. Andreev: <https://orcid.org/0000-0001-8297-579X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено с поддержкой по бюджетному финансированию (№ проекта ГЗ 144112440122).

Financing. The study was performed with state financial support (project No 144112440122).

Статья поступила: 26.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 26.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.

Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена *LMP1*

К. В. Смирнова^{1,2}, Н. Б. Сеньюта¹, И. В. Ботезату¹, Т. Е. Душенькина¹, А. К. Лубенская¹, А. А. Фроловская¹,
С. В. Петров³, А. В. Лихтенштейн¹, В. Э. Гурцевич¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Н. Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России;
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Татарстан;
Республика Татарстан, 420029 Казань, тракт. Сибирский, 29

Контакты: Ксения Валерьевна Смирнова skv.lab@yandex.ru

Цель исследования — изучение инфицированности вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) этнических татар и анализ генетической структуры онкогена вируса, латентного мембранного белка 1 (*LMP1*), в штаммах вируса татарского происхождения.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили буккальные смывы 60 студентов Казанского государственного медицинского университета, являющихся этническими татарами (не менее чем в III поколении). Выделенную из смывов ДНК использовали для амплификации *LMP1*. Амплифицированные из ДНК буккальных смывов нуклеотидные последовательности образцов *LMP1*, транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись классификации на основании известной и широко используемой в литературе классификации R. H. Edwards и соавт.

Результаты. Анализ нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей 41-го ампликона *LMP1* выявил их гомологию только с 3 вариантами гена из классификации R. H. Edwards и соавт.: 95.8/A (29,3 %; 12/41), Med– (14,6 %; 6/41) и China1 (7,3 %; 3/41). Такие варианты *LMP1*, как Alaskan, Med+, China2, China3 и NC, не обнаружены. В остальных 20 случаях (48,8 %) спектр обнаруженных мутаций в образцах *LMP1* татарского происхождения не позволил их отнести ни к одному из перечисленных выше вариантов онкогена. Из них в 7 случаях (17,1 % всех исследованных образцов) обнаружена моногруппа вариантов *LMP1*, отличающаяся не только от представителей славян, жителей европейской части России, но и от других казанских образцов, и обозначенная нами, как *LMP1-Tat^k*. Остальные 13 образцов *LMP1* (31,7 %), не относящихся ни к одной из известных классификаций, сформировали группу, обозначенную нами, как группа *LMP1* вне классификации (*LMP1^{BK}*).

Заключение. Дальнейшее изучение молекулярно-биологических и функциональных свойств *LMP1* в группах BK и *Tat^k*, составляющих 48,8 % от числа изученных образцов онкобелка, и анализ особенностей генотипа этнических татар, вероятно, позволят выяснить, оказывают ли определенные штаммы ВЭБ влияние на показатели заболеваемости и смертности злокачественными новообразованиями, в состав которых входят ВЭБ-ассоциированные случаи, у татарского населения.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, латентный мембранный белок 1, этнические татары, сиквенсный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, копии ДНК ВЭБ

Для цитирования: Смирнова К. В., Сеньюта Н. Б., Ботезату И. В. и др. Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена *LMP1*. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):65–74.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74

Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of *LMP1* oncogene

K. V. Smirnova^{1,2}, N. B. Senyuta¹, I. V. Botezatu¹, T. E. Dushenkina¹, A. K. Lubenskaya¹, A. A. Frolovskaya¹, S. V. Petrov³,
A. V. Lichtenstein¹, V. E. Gurtsevitch¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Pirogov National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

³Republican Clinical Oncological Dispensary, Ministry of Health of the Republic of Tatarstan;
29 Sibirskiy Trakt, Kazan 420029, Republic of Tatarstan

Objective of the investigation was to study the infection of ethnic Tatars with the Epstein–Barr virus (EBV) and to analyze the genetic structure of the oncogene of the virus, the latent membrane protein 1 (*LMP1*), in the virus strains of Tatar origin.

Materials and methods. The materials for the study were samples of boucle flushes of 60 students from the Kazan State Medical University who are ethnic Tatars (Tatars no less than in the 3rd generation). Amplified from DNA of boucle flushes the nucleotide sequences of the *LMP1* samples translated into DNA amino acid sequences, have undergone classification based on the well-known and widely used in literature the R. H. Edwards et al. classification.

Results. The analysis of nucleotide and deductive amino acid sequences of the 41 *LMP1* amplicons revealed their homology with only three gene variants from the R. H. Edwards et al. classification (1999): 95.8/A (29.3 %; 12/41), Med– (14.6 %; 6/41) and China1 (7.3 %, 3/41).

Such variants of LMP1 as Alaskan, Med+, China2, China3 and NC, were not found. Among the LMP1 samples of Tatar origin in 20 cases (48.8 %), the composition of the mutations found did not allow them to be assigned to any of the oncogene variants listed above. Out of this number, in 7 (17.1 %) cases a mono group of LMP1 samples was found, differing not only from representatives of the Slavs, inhabitants of the European part of Russia, but also from other Kazan samples, and was designated as LMP1-Tat^K. The remaining 13 samples of LMP1 (31.7 %), not belonging to any of the known classifications, formed the group designated by us as an LMP1 group beside the classification (LMP1^{BC}).

Conclusion. Continuation of the study of the molecular-biological and functional properties of LMP1 in Tat^K and BC groups, which constitute 48.8 % of the number of gene samples studied, and an analysis of the peculiarities of the ethnic Tatar genotype, will probably help to clarify whether certain EBV strains influence morbidity and mortality in Tatar population with malignant neoplasms, which include EBV-associated cases.

Key words: Epstein–Barr virus, latent membrane protein 1, ethnic Tatars, sequence analysis, real time polymerase chain reaction, copy of EBV DNA

For citation: Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V. et al. Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):65–74.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), или лимфотропный герпес-вирус человека 4 (HHV4), представляющий собой двуспиральную ДНК с размером генома около 170 тыс. пар нуклеотидов, пожизненно инфицирует до 95 % взрослого населения планеты [1]. Заражение вирусом происходит при контакте со слюной инфицированного человека, однако переливание крови и трансплантация органов от инфицированных ВЭБ лиц также являются возможными путями его распространения [2]. В раннем детском возрасте заражение вирусом происходит обычно бессимптомно, тогда как инфицирование молодых людей, ранее не встречавшихся с вирусом, может привести к возникновению инфекционного мононуклеоза [3].

У здорового человека В-лимфоциты (преимущественно В-клетки памяти) и эпителиальные клетки — основные мишени вируса. ВЭБ первично инфицирует эпителиальные клетки слизистой оболочки, которая выстилает носоглотку и лимфоидные образования, окружающие вход в дыхательные и пищеварительные пути (кольцо Пирогова–Вальдейера), состоящее из миндалин и аденоидов) [4]. Инфицированные вирусом клетки, но не относящиеся к В-лимфоцитам, также могут определять развитие и патогенез ряда ВЭБ-ассоциированных патологий [5]. Через кольцо Вальдейера вирус проникает в периферическую кровь и инфицирует В-клетки памяти, в которых персистирует всю жизнь [6]. В этих клетках не происходит экспрессии латентных белков, лишь с эписомальной вирусной ДНК транскрибируются нетранслируемые РНК. Распознавание «родственного» антигена рецептором В-клеток памяти способно реактивировать ВЭБ из пула этих клеток, а дифференцировка плазматических клеток приводит к продукции литического инфекционного вируса. Благодаря циркуляции В-клеток памяти в кровотоке вирус внедряется во все отделы периферической лимфоидной системы и возвращается в полость рта через упомянутое лимфоидное кольцо. При этом содержание инфицированных В-клеток памяти в популяции лимфоидных элементов кольца Вальдейе-

ра и периферической крови, по данным L.L. Laichalk и соавт., оказалось достаточно близким. На каждые 10 млн В-клеток в этих лимфоидных образованиях число инфицированных В-клеток памяти составило в среднем 175 и 110 соответственно, хотя в периферической крови находится менее 1 % инфицированных В-клеток. В-клеток памяти, инфицированных ВЭБ, в В-клеточной популяции селезенки или брыжеечных лимфатических узлов обнаружено приблизительно в 20 раз меньше [7].

В организме здорового человека вирус находится под жестким иммунологическим контролем [8]. Ослабление по разным причинам иммунитета позволяет вирусу активно размножаться, а восстановление иммунокомпетентности подавляет репликацию вируса, снижая ее до фонового уровня. В инфицированном организме вирус, как правило, избегает распознавания иммунной системой. Это происходит благодаря экспрессии в В-лимфоцитах памяти ограниченного числа вирусных генов, а также в результате нарушения механизма экспрессии вирусных антигенов на поверхности этих клеток [9].

Являясь убиквитарным вирусом, ВЭБ в то же время инициирует целый ряд доброкачественных и злокачественных патологий. Среди доброкачественных новообразований — упомянутый выше инфекционный мононуклеоз и волосатая лейкоплакия полости рта. К числу злокачественных неоплазий относят лимфому Беркитта, недифференцированный гистологический вариант рака носоглотки, определенные гистологические варианты классической лимфомы Ходжкина, целый ряд неходжкинских лимфом, возникающих на фоне иммунодефицитных состояний различного генеза, определенные варианты рака желудка и др. [10].

Результатами многочисленных исследований показано, что в развитии ВЭБ-ассоциированных патологий активное участие принимает один из генов латентной инфекции вируса — латентный мембранный белок 1 (LMP1), кодирующий одноименный онкобелок LMP1. Этот белок обладает способностью стимулировать клеточный рост, ингибировать апоптоз в различных

типах клеток [11, 12] и индуцировать опухоли у трансгенных мышей [13]. Он обладает сниженной иммуногенностью и усиленной сигнальной активностью [14, 15]. Результаты исследований показали, что нуклеотидные замены у различных образцов *LMP1*, как правило, расположены в областях, контролирующих стадии транскрипции или трансляции [16, 17]. В состав онкобелка входят аминокислоты, влияющие на функциональную активность, иммуногенность, время полужизни или трансформирующий потенциал *LMP1*, которые у вирусных изолятов разного географического происхождения могут существенно различаться [10]. Известный в литературе вариант онкобелка *LMP1* Cao (*LMP1*^{Ca0}) китайского происхождения, в отличие от прототипного варианта *LMP1*^{B95.8} американского происхождения, содержит в С-терминальном домене характерную 10-членную делецию (30 пар нуклеотидов (п.н.)), прилегающую к области STAR2, 3 11-аминокислотного повтора, многочисленные точечные мутации и обладает более выраженной туморогенной активностью [18].

С-терминальный домен оказался наиболее изученным из идентифицированных доменов *LMP1* [1]. Его анализ в различных географических регионах позволил R. H. Edwards и соавт. в 1999 г. предложить широко используемую в настоящее время классификацию, согласно которой все изученные ими образцы *LMP1* были разделены на варианты, отличающиеся по содержанию ключевых аминокислотных замен по отношению к прототипному варианту *LMP1*^{B95.8} [19]. В предложенной классификации варианты *LMP1* названы в соответствии с географическим регионом их происхождения: Alaskan, China1, China2, China3, Mediterranean+ (Med+), Mediterranean– (Med–) и North Carolina (NC) [19]. Однако, поскольку упомянутая классификация *LMP1* создана для штаммов ВЭБ, циркулирующих среди населения ограниченного числа территорий, возникает вопрос о корректности ее применения для анализа *LMP1* из других географических регионов [20, 21]. К сожалению, классификация, которая отражала бы структурные особенности гена из разных стран и континентов, населенных различными народами и этническими группами, до сих пор не сформирована. В то же время известно, что генетическая структура населения, вредные факторы окружающей среды и спектр ВЭБ-ассоциированных заболеваний в разных регионах могут существенно отличаться, и нельзя исключить, что варианты *LMP1* для этих популяций будут содержать уникальные структурные изменения, не относящиеся к предложенной классификации.

Цель исследования — изучение штаммов ВЭБ у одного из древнейших народов России, поволжских татар, компактно проживающих в Республике Татарстан. В частности, представлялось важным выяснить, отличаются ли штаммы вируса, персистирующие среди этнических татар г. Казани от штаммов ВЭБ, циркулирующих у представителей славянских народов

г. Москвы, и различаются ли уровни заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями в сравниваемых регионах. Для реализации поставленной задачи исследовали подверженный выраженному полиморфизму С-терминальный домен *LMP1* вирусных изолятов, полученных из буккальных смывов изучаемых лиц 2 мегаполисов. Об уровнях ВЭБ-ассоциированной патологии косвенно судили по показателям заболеваемости и смертности от новообразований соответствующих локализаций в Москве и Татарстане.

Материалы и методы

Объекты исследования. Изучению были подвергнуты буккальные смывы 60 студентов Казанского государственного медицинского университета (КГМУ), являющихся этническими татарами (не менее чем в III поколении). Изучаемая группа студентов состояла из 15 представителей мужского пола и 45 — женского, средний возраст составил 21,5 года. Аналогичные смывы получены от 13 детей, посещающих детский сад, средний возраст которых составил 5,08 года, и от 40 здоровых взрослых лиц (21 мужчины и 19 женщин), средний возраст — 47,5 года. Последние 2 группы лиц являются коренными жителями г. Москвы славянского происхождения.

Каждый смыв представлял собой суспензию клеток, полученных индивидуально от каждого лица, после полоскания полости рта 15 мл стерильного физиологического раствора в течение 30 с. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре +4 °С не более 2 сут до исследования. Все обследуемые лица, включенные в результате случайной выборки, подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*. ДНК из собранных буккальных смывов выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Наличие вирусной ДНК в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, описанном нами ранее [22]. Амплификацию *LMP1* проводили в 2 этапа с соответствующими внешними и внутренними праймерами по ранее использованной нами методике [23]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке Qiagen (Германия) согласно инструкции производителя. Для реакции использовали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля применяли 1 мкг ДНК, выделенной из используемой в качестве стандарта клеточной линии B95.8, в качестве отрицательного контроля — дистиллированную воду.

Секвенирование ПЦР-продуктов *LMP1*. Ампликоны онкогена *LMP1* секвенировали в обоих направлениях. Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant

(США). Обработку данных секвенирования выполняли с использованием программ Chromas 230 и Vector NTI.

Классификация LMP1. Нуклеотидные последовательности образцов *LMP1*, амплифицированных из ДНК буккальных смывов и транслированных в аминокислотные последовательности, подверглись классификации на основании совокупности мутаций, ведущих к заменам отдельных аминокислот, формированию делеций и дупликаций. За основу была принята известная в литературе классификация, сформированная на базе сиквенсного анализа белковых аналогов гена *LMP1*, полученных от больных ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира [19]. При этом показано, что вариант *LMP1*^{China1} является аналогом высоко-туморогенного варианта *LMP1*^{Ca0} [19, 24].

Количественное определение числа копий вирусной ДНК. Число копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы крови определяли методом ПЦР в реальном времени. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК/1 копия вирусной ДНК [25]. Для ПЦР в реальном времени применяли праймеры к фрагменту размером 76 п. н. в области BamHI-W вирусной ДНК (GenBank ID: V01555): смысловой праймер W-44F (5'-CCCAACACTCCACC-ACACC); антисмысловой праймер W-119R (5'-TCTTAG-GAGCTGTCCGAGGG); флуоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACACTACA-CACACCCACCCGTCTC-RTQ1) [26]. Возможность использования ДНК плазмы крови как матрицы в ПЦР оценивали, взяв в качестве контроля уникальный ген *K-RAS*, как описано ранее [27]. Реакцию вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) в 50 мкл реакционной смеси (Синтол, Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого из праймеров, 25 нМ флуоресцентного зонда, 4 мМ MgCl₂, 200 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере 10 мМ Трис-НCl (pH 8,0), 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали 2 отрицательных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при температуре 95 °С; 40 циклов при температуре 95 °С 15 с и при 56,5 °С 30 с. Данные ПЦР в реальном времени анализировали с помощью программы CFX Manager (BioRad, США).

Результаты и обсуждение

Известно, что население многонациональной России состоит из многочисленных древних этносов, сохранивших собственную культуру, обычаи и населяющих, как правило, исторически закрепленные за ними территории. Поэтому представляется важным провести сравнительную характеристику персистирующих у этих народов штаммов ВЭБ, передаваемых из поколения в поколение на протяжении веков.

Представителем таких этносов являются татары, 2-м по численности после русских народом в России. При этом одну из основных групп татарского народа формируют казанские татары. Следует отметить, что не менее половины (а по данным ряда источников, даже более половины) населения г. Москвы составляют представители славянской национальности. Несмотря на то, что данные по этническому составу г. Москвы разнятся, в г. Казани этнический состав более однороден, а численность татарского населения не намного, но превышает число представителей славянских народов.

О вариантах штаммов ВЭБ, циркулирующих среди этнических татар г. Казани, можно судить по полиморфизму *LMP1* в буккальных смывах студентов КГМУ (табл. 1). Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 41-го ампликона *LMP1*, полученных из 60 буккальных смывов (из остальных образцов амплифицировать *LMP1* не удалось), выявил их существенную вариабельность, но гомологию только с 3 вариантами гена из классификации R. H. Edwards и соавт. [19]: B95.8/A (29,3 %; 12/41), Med- (14,6 %; 6/41) и China1 (7,3 %; 3/41). При этом такие варианты *LMP1*, как Alaskan, Med+, China2, China3 и NC, не обнаружены. У представителей славян г. Москвы, в отличие от образцов *LMP1* татарского происхождения, подавляющее число образцов относилось к варианту B95.8/A (82,5 %; 33/40), остальные соответствовали другим вариантам белка изучаемого вирусного онкогена – NC (7,5 %; 3/40), China1 (7,5 %; 3/40) и Med- (2,5 %; 1/40).

Среди образцов *LMP1* татарского происхождения в 20 (48,8 %) случаях состав обнаруженных мутаций не позволил их отнести ни к одному из перечисленных выше вариантов. Из них в 7 (17,1 %) случаях обнаружена моногруппа образцов *LMP1*, отличающаяся не только от московских, но и от других казанских образцов, и обозначенная нами, как *LMP1-Tat^K*. Остальные 13 (31,7 %) образцов *LMP1*, не относящихся ни к одной из известных классификаций, сформировали группу, обозначенную нами, как группа *LMP1* вне классификации (*LMP1^{BK}*).

У большинства образцов *LMP1* татарского происхождения при сиквенсном анализе обнаружены так называемые Ca0-ассоциированные мутации. Одна из таких мутаций, делеция 5 аминокислот (а.к.) (276–280 а.к.), встречающаяся в 16 (39 %) образцах, относится к области гена STAR-3. Эта область обеспечивает активацию сигнального пути Jak3/STAT и локализована между областями STAR-1 и STAR-2 вирусного генома. В 22 (53,7 %) образцах содержалась нехарактерная для известных в литературе вариантов *LMP1* вставка 33 а.к. (302–303 а.к.), локализованная в той же области STAR-3. Выявлены и единичные, не встречающиеся в известных вариантах *LMP1* точечные мутации. Среди них обнаруженная в 7 (17,1 %) случаях мутация в кодоне 252 (G→A), относящаяся к STAR-2 – области,

Таблица 1. Спектр вариантов LMP1, обнаруженных в изолятах вируса Эпштейна–Барр из буккальных смывов славян и этнических татар
Table 1. Spectrum of LMP1 variants found in the isolates of the Epstein–Barr virus from the buccal flushes of slavians and ethnic Tatars

| Число обследованных лиц, <i>n</i> Number of examined persons, <i>n</i> | Число амплифицированных образцов LMP1, <i>n</i> (%) Number of amplified LMP1 samples, <i>n</i> (%) | Варианты LMP1 по классификации R.H. Edwards и соавт. [19], <i>n</i> (%) Всего 21 (51,2 %) образец LMP1 variants per the R.H. Edwards et al. [19] classification, <i>n</i> (%) 21 (51.2 %) samples in total | | | | Варианты LMP1, не поддающиеся классификации, <i>n</i> (%) Всего 20 (48,8 %) образцов LMP1 variants that can't be classified, <i>n</i> (%) 20 (48.8 %) samples in total | |
|---|---|--|----------|---------|----------------|--|---|
| | | B95.8/A | Med– | China1 | North Carolina | Вне классификации R.H. Edwards и соавт. [19] Outside the R.H. Edwards et al. [19] classification | Характерные для этнических татар (TatK) Characteristic of ethnic Tatars (TatK) |
| Этнические татары г. Казани <i>Ethnic Tatars of Kazan</i> | | | | | | | |
| 60 | 41 (69,5) | 12 (29,3) | 6 (14,6) | 3 (7,3) | 0 | 13 (31,7) | 7 (17,1) |
| Славяне г. Москвы <i>Slavic diaspora of Moscow</i> | | | | | | | |
| 40 | 40 (100) | 33 (82,5) | 1 (2,5) | 3 (7,5) | 3 (7,5) | 0 | 0 |

рекрутирующей TNFR-ассоциированный белок домена смерти (TRADD) и так называемый рецептор-взаимодействующий белок (RIP). В 6 (14,6 %) случаях выявлены мутации в кодоне 317 (D→E) (область STAR-3), а в 5 (12,2 %) – в кодоне 229 (S→T). Последняя замена расположена в области STAR-1, активно взаимодействующая с TNRF-белками (TRAF1, -2, и -5). Можно предположить, что обнаруженные мутации меняют профиль внутриклеточной активности ряда сигнальных путей и их биологическую активность.

Однако особый интерес представляют 7 образцов LMP1-Tat^K, отличающихся от остальных образцов татарского происхождения и образцов LMP1 не только здоровых лиц, но также от больных злокачественными опухолями из разных регионов России [28]. Эта группа образцов характеризовалась сочетанным содержанием делеций 5 а.к. в кодонах 312–316 и 382–386 (табл. 2). Вариант же LMP1-Tat^K с учетом генеалогии изучаемых лиц (татары, по крайней мере, в III поколении) возможно относится к эволюционно древнему штамму вируса.

В ряде работ показано, что С-терминальный домен у образцов LMP1 содержит различное число повторов, состоящих из 11 а.к. (PQDPNTDDMG), локализованных между а.к. 253 и 306 [24, 29]. Прототипный вариант LMP1-B95.8 содержит 4 таких повтора и 2 вставки, состоящие из 5 а.к. (PHDPL): одна (275–279) располагается между 2-м и 3-м повторами, другая (302–306) – после последнего повтора. Вставка 5 а.к. представляет собой так называемый JAK3-сайт области STAR3 (275–330 а.к.), предположительно участвующей в JAK3/STAT-сигналинге [25, 30]. Для того чтобы выяснить структуру у изучаемых LMP1-образцов, полученных от этнических татар, С-терминальные домены этих образцов анализировали на содержание в них

повторов и вставок (рис. 1). Исследованию подвергли 41 образец, обозначенный на рис. 1 буквой «Т». Структура из 11 а.к. повторов и 5 а.к. вставок, подобная прототипному штамму LMP1^{B95.8}, обнаружена для 17 образцов. Семь повторов из 11 а.к. содержал 21 образец, у 12 из которых отсутствовала вставка 5 а.к. между 2-м и 3-м повторами, присутствующая у прототипного варианта LMP1^{B95.8}. Кроме того, у 17 образцов выявлены точечные мутации D→G в области 11 а.к. повторов. Подобные мутации нами были обнаружены ранее у россиян кавказского происхождения, больных раком носоглотки [28]. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что изоляты ВЭБ от этнических татар содержат варианты LMP1, обладающие как B95.8-подобной структурой повторяющихся элементов, так и структурой, характерной для вариантов онкогена африканского и японского происхождения [30]. Однако, в отличие от японских изолятов ВЭБ, как в татарских, так и российских изолятах, часто встречаются точечные мутации D→G. Различия в числе повторов и вставок JAK3 мотива 5 а.к. между повторами объясняется рекомбинациями, возникающими в процессе репликации вируса [24]. Однако существуют гипотезы, объясняющие мутационные изменения географическим происхождением ВЭБ [30].

Из данных литературы и результатов собственных исследований известно, что слюна даже здоровых лиц, как правило, содержит вирусные частицы. Последние, смешиваясь со слюной, оказываются в полости рта в результате разрушения литически инфицированных ВЭБ эпителиальных клеток слизистой оболочки, выстилающей носоглотку и кольцо Вальдейера. При этом в слюне концентрация вирусных частиц оказывается гораздо выше, чем в периферической крови.

Таблица 2. Мутации С-терминального домена у образцов $LMP1^{B95.8}$, $LMP1^{Ca0}$ и $LMP1^{Tat}$ Table 2. Mutations of the C-terminal domain in $LMP1^{B95.8}$, $LMP1^{Ca0}$, and $LMP1^{Tat}$ samples

| Образец LMP1 sample | Мутации в STAR-областях гена $LMP1$ Mutations in the STAR-regions of the $LMP1$ gene | | | Сао-ассоциированные мутации $LMP1$ Ca0-associated $LMP1$ mutations | | | Мутации $LMP1$ вне известных классификаций $LMP1$ mutations outside known classifications | |
|---|---|---------------------------------------|--|---|--|---|--|---|
| | STAR-1 191–232 | STAR-2 351–386 | STAR-3 275–330 | Делеция 276–280 (5 а.к.) Deletion 276–280 (5 a.a.) | Вставка 302–303 (11 а.к. x3) Insertion 302–303 (11 a.a. x3) | Делеция 346–355 (10 а.к.) Deletion 346–355 (10 a.a.) | Делеция 312–316 (5 а.к.) Deletion 312–316 (5 a.a.) | Делеция 382–386 (5 а.к.) Deletion 382–386 (5 a.a.) |
| Варианты *$LMP1^{B95.8}$ и **$LMP1^{Ca0}$ * $LMP1^{B95.8}$ and ** $LMP1^{Ca0}$ variants | | | | | | | | |
| *B95.8 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| **Ca0 | Мутация G212S Mutation G212S | Мутация S366T Mutation S366T | Делеция 276–280 Мутация Q322N Deletion 276–280 Mutation Q322N | + | + | + | – | – |
| Варианты $LMP1^{Tat}$ $LMP1^{Tat}$ variants | | | | | | | | |
| T-2 | – | – | 276–280; Q322N | + | + | – | + | + |
| T-4 | S229T | – | 276–280; Q322N | + | + | – | + | + |
| T-5 | S229T | S366T | 276–280; Q322N | + | + | – | + | + |
| T-6 | S229T | – | 276–280; Q322N | + | + | – | + | + |
| T-33 | S229T | S366A | – | – | + | – | + | + |
| T-44 | – | S366T | 276–280; Q322N | + | + | – | + | + |
| T-45 | S229T | – | – | – | – | – | + | + |

Примечание. $LMP1^{B95.8}$ – прототипный вариант гена; $LMP1^{Ca0}$ – высокотрансформирующий вариант гена; $LMP1^{Tat}$ – вариант гена, характерный только для этнических татар г. Казани; а.к. – аминокислоты.

Note. $LMP1^{B95.8}$ – prototype gene variant; $LMP1^{Ca0}$ – highly transforming variant; $LMP1^{Tat}$ – gene variant characteristic only of ethnic Tatars of Kazan; a.a. – amino acids.

В нашем исследовании медиана чисел копий ДНК ВЭБ в 15 мл буккального смыва варьировала от 0 у московских детей 5-летнего возраста и 833 у взрослых москвичей старше 40 лет до 3538 у 20-летних студентов КГМУ (табл. 3). Однако медиана чисел копий вирусной ДНК, приходящихся на 1 клетку в одном и том же объеме буккального смыва, была нулевой у детей и студентов и практически нулевой (0,01) у взрослых лиц. Полученные данные, вероятно, свидетельствует об умеренной репликации вируса в слизистой оболочке полости рта у здоровых лиц разного возраста, поскольку на 1 клетку клеточной суспензии смыва приходилось менее 1 копии вирусного генома.

Более высокий уровень полиморфизма гена $LMP1$ для штаммов ВЭБ, персистирующих среди этнических татар г. Казани по сравнению с таковым у представителей славянской популяции в г. Москве (см. табл. 1), позволил предположить наличие более высоких показателей заболеваемости и смертности для татарского населения определенными формами злокачественных

новообразований, в состав которых входят ВЭБ-ассоциированные случаи. Действительно, содержание низкотрансформирующего варианта $LMP1^{B95.8}$ среди вирусных изолятов этнических татар оказалось существенно ниже, чем среди таковых у московских славян (29,3 и 82,5 % соответственно). Более того, в отличие от вирусных изолятов московского происхождения, содержащих кроме $LMP1^{B95.8}$ в небольшом проценте случаев варианты $LMP1^{NC}$ (7,5 %), $LMP1^{Chinal}$ (7,5 %) и $LMP1^{Med-}$ (2,5 %), среди изолятов татарского происхождения обнаружены аналогичные высокотрансформирующие варианты $LMP1^{Chinal}$ (7,3 %), и $LMP1^{Med-}$ (14,6 %), а также варианты с неизвестным трансформирующим потенциалом ВК (31,7 %) и Tat^k (17,1 %). Для того чтобы выяснить обоснованность высказанного предположения, в перечень анализируемых патологий были включены новообразования полости рта, глотки, желудка, а также злокачественные лимфомы (рис. 2). Как известно, среди опухолей полости рта определенную часть составляют ВЭБ-ассоциированные случаи

Таблица 3. Инфицированность полости рта ВЭБ у представителей разных возрастных групп

Table 3. Oral infection by EBV in representatives of different age groups

| Группа Group | Число наблюдений Number of observations | Средний возраст, лет Mean age, years | Число копий ДНК ВЭБ в 15 мл буккального смыва Number of EBV DNA copies in 15 ml of buccal lavage | | Число клеток в 15 мл буккального смыва Number of cells in 15 ml of buccal lavage | | Число копий ДНК ВЭБ на 1 клетку буккального смыва Number of EBV DNA copies per 1 cell in buccal lavage | |
|--------------------------------------|--|---|---|------------|---|-------------------|---|------------|
| | | | Медиана Median | МКИ IQR | Медиана Median | МКИ IQR | Медиана Median | МКИ IQR |
| Дети г. Москвы Children of Moscow | 13 | 5,08 | 0 | 0–1056 | 313917 | 90084–582917 | 0 | 0–0,008 |
| Студенты КГМУ KSMU students | 60 | 21,5 | 3538 | 0–183792 | 28229167 | 20183333–38150000 | 0 | 0–0,009 |
| Здоровые взрослые Healthy adults | 40 | 47,5 | 833 | 0–3281025 | 37118174 | 23065080–69397634 | 0,01 | 0–0,257 |

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; МКИ – межквартильный интервал; КГМУ – Казанский государственный медицинский университет.

Note. EBV – Epstein–Barr virus; IQR – interquartile range; KSMU – Kazan State Medical University.

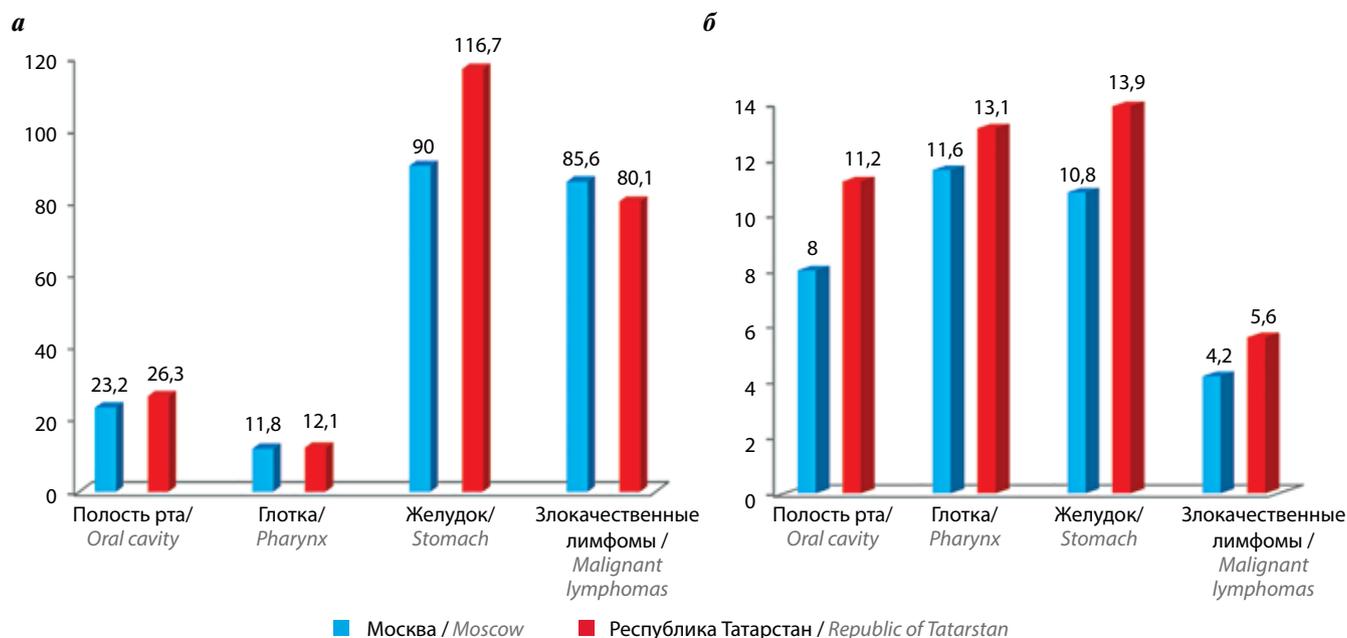


Рис. 2. Показатели заболеваемости и летальности для некоторых форм опухолей, в состав которых входят случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр [37]: а – заболеваемость (%) опухолями полости рта, глотки, желудка и злокачественными лимфомами на 100 тыс. населения, находившихся на учете в 2016 г. в г. Москва и Республике Татарстан; б – летальность (%) от опухолей полости рта, глотки, желудка и злокачественных лимфом на 100 тыс. населения, находившихся на учете в 2016 г. в г. Москва и Республике Татарстан

Fig. 2. Morbidity and mortality for some types of tumors including cases associated with the Epstein–Barr virus [37]: а – morbidity for tumors of the oral cavity, pharynx, stomach and malignant lymphomas per 100 people on file in 2016 in Moscow and the Republic of Tatarstan; б – mortality (%) for tumors of the oral cavity, pharynx, stomach and malignant lymphomas per 100 people on file in 2016 in Moscow and the Republic of Tatarstan

и связанной с ним повышенной чувствительностью или резистентностью к тем или иным новообразованиям.

Заключение

Дальнейшие исследования, в частности изучение молекулярно-биологических свойств LMP1 в группах

ВК и Tat^K, составляющих 48,8 % от числа изученных образцов гена, и особенности генотипа этнических татар, вероятно, позволят выяснить, оказывают ли влияние определенные штаммы ВЭБ на показатели заболеваемости и смертности у татарского населения.

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

- Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M. et al. The extent of genetic diversity of Epstein–Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* 2009;143(2):209–21. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.07.005. PMID: 19596032.
- Gerber P., Walsh J.H., Rosenblum E.N. et al. Association of EB-virus infection with the post-perfusion syndrome. *Lancet* 1969;1(7595):593–5. PMID: 4180127.
- Santpere G., Darre F., Blanco S. et al. Genome-wide analysis of wild-type Epstein–Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol* 2014;6(4): 846–60. DOI: 10.1093/gbe/evu054. PMID: 24682154.
- Borza C.M., Hutt-Fletcher L.M. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat Med* 2002;8(6):594–9. DOI: 10.1038/nm0602–594. PMID: 12042810.
- Kasahara Y., Yachie A. Cell type specific infection of Epstein–Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44(3):283–94. PMID: 12467968.
- Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):757–68. DOI: 10.1038/nrc1452. PMID: 15510157.
- Laichalk L.L., Hochberg D., Babcock G.J. et al. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity* 2002;16(5):745–54. PMID: 12049725.
- Rickinson A.B., Long H.M., Palendira U. et al. Cellular immune controls over Epstein–Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol* 2014;35(4):159–69. DOI: 10.1016/j.it.2014.01.003. PMID: 24589417.
- Rickinson A.B., Moss D.J. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein–Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997;15:405–31. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.405. PMID: 9143694.
- Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens* 2012;1(2):156–74. DOI: 10.3390/pathogens1020156. PMID: 25436768.
- Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(19):9150–4. PMID: 8415670.
- Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. All three domains of the Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein LMP1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* 1993;67(3):1638–46. PMID: 8382313.
- Kulwichit W., Edwards R.H., Davenport E.M. et al. Expression of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11963–8. PMID: 9751773.
- Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F. et al. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1991;72(Pt 10):2399–409. DOI: 10.1099/0022-1317-72-10-2399. PMID: 1681026.
- Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W., Young L.S. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1(LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* 2001;282(2):278–87. DOI: 10.1006/viro.2001.0828. PMID: 11289810.
- Farrell P.J. Signal transduction from the Epstein–Barr virus LMP-1 transforming protein. *Trends Microbiol* 1998;6(5):175–7. PMID: 9614338.
- Huen D.S., Henderson S.A., Croom-Carter D., Rowe M. The Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 1995;10(3):549–60. PMID: 7845680.
- Dirmeier U., Neuhierl B., Kilger E. et al. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein–Barr virus. *Cancer Res* 2003;63(11):2982–9. PMID: 12782607.
- Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology* 1999;261(1):79–95. DOI: 10.1006/viro.1999.9855. PMID: 10441557.
- Feederle R., Klinke O., Kutikhin A. et al. Epstein–Barr virus: from the detection of sequence polymorphisms to the recognition of viral types. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;390(Pt 1):119–48. DOI: 10.1007/978-3-319-22822-8_7. PMID: 26424646.
- Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein–Barr virus strains and variations: geographic or disease-specific variants? *J Med Virol* 2017;89(3):373–87. DOI: 10.1002/jmv.24633. PMID: 27430663.
- Gurtsevitch V.E., Iakovleva L.S., Shcherbak L.N. et al. The LMP1 oncogene sequence variations in patients with oral tumours associated or not associated with the Epstein–Barr. *Mol Biol (Mosk)* 2013;47(6):987–95. PMID: 25509860.
- Hahn P., Novikova E., Scherback L. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int J Cancer* 2001;91(6):815–21. PMID: 11275985.
- Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 10):2729–40. DOI: 10.1099/0022-1317-75-10-2729. PMID: 7931159.
- Lawrence J.B., Villnave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 1988;52(1):51–61. PMID: 2830981.
- Lo Y.M., Chan L.Y., Lo K.W. et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein–Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(6):1188–91. PMID: 10096545.
- Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant KRAS. *Anal Biochem* 2011;419(2):302–8. DOI: 10.1016/j.ab.2011.08.015. PMID: 21889482.
- Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E. et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J Med Virol* 2014;86(2): 290–300. DOI: 10.1002/jmv.23729. PMID: 24009107.
- Li H.P., Chang Y.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* 2003;10(5):490–504. DOI: 10.1159/000072376. PMID: 12928589.
- Kanai K., Satoh Y., Saiki Y. et al. Difference of Epstein–Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt’s lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes* 2007;34(1):55–61. DOI: 10.1007/s11262-006-0010-y. PMID: 16917741.
- Wilmes E., Wolf H., Haus M. Tonsillar cancer and Epstein–Barr virus. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1983;62(12):586–9. PMID: 6323895.
- Wu L.Y., Cheng J., Lu Y. et al. Epstein–Barr virus infection in benign lymphoepithelial lesions with malignant transformation of salivary glands.

- Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2004;39(4):291–3. PMID: 15454012.
33. Ayadi W., Khabir A., Hadhri-Guiga B. et al. North African and Southeast Asian nasopharyngeal carcinomas: between the resemblance and the dissemblance. *Bull Cancer* 2010;97(4):475–82. DOI: 10.1684/bdc.2010.1090. PMID: 20385521.
34. Namikawa T., Fujisawa K., Munekage E. et al. Epstein–Barr virus-associated early gastric carcinoma with lymphoid stroma, accompanied with lymph node metastasis. *Mol Clin Oncol* 2018;8(4):561–6. DOI: 10.3892/mco.2018.1567. PMID: 29541465.
35. Alexander F.E., Jarrett R.F., Lawrence D. et al. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein–Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer* 2000;82(5):1117–21. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1049. PMID: 10737396.
36. Andreone P., Gramenzi A., Lorenzini S. et al. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Intern Med* 2003;163:1997–2004. DOI: 10.1001/archinte.163.17.1997. PMID: 14504111.
37. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2017. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2016. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2017. 236 p. (In Russ.).]

Вклад авторов

К.В. Смирнова: идея и дизайн исследования, редактирование рукописи;
 Н.Б. Сеньюта: сиквенсный анализ гена *LMP1*;
 И.В. Ботезату: секвенирование фрагментов вирусной ДНК;
 Т.Е. Душенькина: первичная обработка смывов полости рта;
 А.К. Лубенская: постановка полимеразной цепной реакции, анализ полученных результатов;
 А.А. Фроловская: выделение ДНК из анализируемых образцов;
 С.В. Петров: организация и сбор исследуемого материала;
 А.В. Лихтенштейн: анализ концентрации ДНК вируса Эпштейна–Барр в анализируемых пробах;
 В.Э. Гурцевич: организация исследования и написание рукописи.

Authors' contributions

K.V. Smirnova: study design and idea, manuscript editing;
 N.B. Senyuta: *LMP1* gene sequencing analysis;
 I.V. Botezatu: sequencing of virus DNA fragments;
 T.E. Dushenkina: primary processing of oral lavage;
 A.K. Lubenskaya: polymerase chain reaction, analysis of the obtained results;
 A.A. Frolovskaya: DNA recovery from the analyzed samples;
 S.V. Petrov: organization and accumulation of the studied material;
 A.V. Lichtenstein: analysis of Epstein–Barr virus DNA concentration in the analyzed samples;
 V.E. Gurtsevitch: study organization and manuscript preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

К.В. Смирнова/K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>
 Н.Б. Сеньюта/N.B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
 И.В. Ботезату/I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
 А.В. Лихтенштейн/A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>
 В.Э. Гурцевич/V.E. Gurtsevitch: <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Минздрава России, а также поддержано грантом Российского научного Фонда (проект № 18-015-00505А).

Financing. Research is conducted under the auspices of the experimental governmental assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation and coordinated by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russia, also it was financially supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No 18-015-00505A).

Информированное согласие. Все участники исследования подписали информированное согласие.

Informed consent. All participants in the study written informed consent.

Статья поступила: 02.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 02.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.

Взаимосвязь ВПЧ-инфицирования карциномы эндометрия с ее клинико-морфологическими особенностями

Т.А. Зыкова, Т.И. Моисеенко, Е.М. Франциянц, М.А. Вовкочина

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
Россия, 344047 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Татьяна Алексеевна Зыкова tatiana2904@yandex.ru

Введение. Данные о выявлении вируса папилломы человека (ВПЧ) в ткани опухоли при раке эндометрия (РЭ) довольно противоречивы.

Цель исследования — изучение распространенности ВПЧ в ткани опухоли при РЭ и установление взаимосвязи статуса ВПЧ-инфицирования с морфологическими характеристиками опухоли.

Материалы и методы. Исследовали 57 образцов, фиксированных в формалине и парафине (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), тканей опухоли больных РЭ в возрасте 47–78 лет. ДНК ВПЧ была обнаружена в 54,4 % образцов.

Результаты и заключение. Не удалось установить взаимосвязи ВПЧ-статуса опухоли с возрастом, наличием метастазов и глубиной инвазии. В то же время обнаружена достоверная взаимосвязь ВПЧ-инфицирования от ряда морфологических характеристик опухоли: гистологического типа (аденокарциномы с очагами плоскоклеточной дифференцировки в 1,8 раза чаще были ВПЧ-положительными, чем без нее; в 1-м случае ткани опухоли чаще были инфицированы 16-м типом ВПЧ, во 2-м — 18-м), степени дифференцировки (в общей когорте и при серозно-папиллярных аденокарциномах со снижением степени дифференцировки опухоли увеличивалась частота ВПЧ-инфицированных образцов от 0 до 81,8 % и от 0 до 100 % соответственно), стадии заболевания (в общей когорте больных удельный вес ВПЧ-положительных опухолей при II стадии был больше в 2,4 раза, а при III стадии в 1,6 раза, чем при I стадии, при этом при стадии IA ВПЧ-положительные опухоли регистрировались в 2,3 раза чаще, чем при IB), типа роста опухоли (среди опухолей с инфильтративным ростом ВПЧ-положительные встречались в 1,7 раза чаще, чем с экзофитным, и в 2,2 раза чаще, чем со смешанным).

Ключевые слова: рак эндометрия, вирус папилломы человека, полимеразная цепная реакция в реальном времени, распространенность ВПЧ, генотип, вирусная нагрузка

Для цитирования: Зыкова Т.А., Моисеенко Т.И., Франциянц Е.М., Вовкочина М.А. Взаимосвязь ВПЧ-инфицирования карциномы эндометрия с ее клинико-морфологическими особенностями. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):75–82.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-75-82

Interrelation of HPV-infection of endometry carcinoma and its clinical-morphological features

T.A. Zykova, T.I. Moiseenko, E.M. Frantsiyants, M.A. Vovkochina

Rostov Research Institute of Oncology; 63 14th Liniya, Rostov-on-Don 344047, Russia

Background. There are contradictory data on the detection of human papillomavirus (HPV) in the tumor tissue in endometrial cancer (EC).

Objective: to assess HPV infection rates in EC tumor tissues and to establish the relationship between the status of HPV infection and tumor morphological characteristics.

Materials and methods. 57 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples of EC patients aged 47–78 years were studied. HPV DNAs were found in 54.4 % of samples.

Results and conclusion. We did not reveal an association between the HPV tumor status and age, metastasis or invasion depth. However, there was an interdependence between HPV infection and some morphological characteristics of the tumor: its histological type (adenocarcinomas with squamous cell differentiation were HPV-positive 1.8 times more frequent compared to adenocarcinomas without one; in the first case, tumor tissues were more often infected with HPV 16, and in the second case with HPV 18); tumor grade (in the total cohort and in serous-papillary adenocarcinomas, tumors with higher grades were more often HPV-infected: from 0 to 81.8 % and from 0 to 100 % respectively); disease stage (in the total cohort the percentage of HPV-positive tumors in stage II was 2.4 times and in stage III — 1.6 times higher than in stage I, and stage IA tumors were HPV-positive 2.3 times more often than IB tumors); type of tumor growth (tumors with infiltrative growth type were HPV-positive 1.7 times more often than with exophytic growth, and 2.2 times more often than with mixed growth). The achieved results do not allow us to conclude with confidence that HPV is the main tumor forming factor in EC.

Key words: endometrial cancer, human papillomavirus, real-time polymerase chain reaction, HPV infection rates, genotype, viral load

For citation: Zykova T.A., Moiseenko T.I., Frantsiyants E.M., Vovkochina M.A. Interrelation of HPV-infection of endometry carcinoma and its clinical-morphological features. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):75–82.

Введение

Важность проблемы рака эндометрия (РЭ) не только не снижается на протяжении многих лет, но и становится более острой по мере роста заболеваемости и неэффективности лечения рецидивов и распространенных форм.

По экспертным данным, из 14 млн новых случаев рака, зарегистрированных в 2012 г., 2,2 млн (15,4 %) связаны с инфекционными агентами. Наиболее важными из них, на совокупную долю которых приходилось 92 % всех наблюдений рака, связанных с инфекцией, были *Helicobacter pylori*, вирус папилломы человека (ВПЧ), вирус гепатита В, вирус гепатита С и вирус Эпштейна–Барр. Помимо 530 тыс. наблюдений рака шейки матки (РШМ) с ВПЧ ассоциировано 113 тыс. заболеваний раком других локализаций [1]. По данным А.А. Костина и соавт., в России с ВПЧ связано развитие РШМ практически в 100 % наблюдений, рака вульвы – в 45 %, рака влагалища – в 40 %, рака анального канала – в 92 %, рака полового члена – в 42,5 %, злокачественных новообразований головы и шеи – в 25 % [2]. ДНК ВПЧ обнаруживают в различных опухолях. Однако, по данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC), убедительные доказательства этиологической роли ВПЧ представлены только для РШМ, рака вульвы, влагалища, пениса, ануса и ротоглотки [3]. Что касается опухолей других локализаций, роль ВПЧ в их развитии остается до конца не выясненной. Данные о распространенности ВПЧ при РЭ малочисленны и крайне противоречивы [4–7], что и побудило нас к проведению настоящей работы.

Цель исследования – провести сравнительный анализ распространенности, типовой принадлежности и вирусной нагрузки ВПЧ в ткани опухоли различной гистологической структуры при РЭ, а также установить возможную взаимозависимость между статусом ВПЧ-инфицирования и некоторыми клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Материалы и методы

Исследовали образцы фиксированных в формалине и парафине (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) тканей опухоли при РЭ. Депарафинизацию проводили с использованием ксилола и этанола 96°, экстракцию вирусной ДНК из ткани опухоли – методом сорбции на колонках с силиконовой мембраной. Выявление ДНК ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Для выявления ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска и определения типа и концентрации вируса в образцах использовали следующие наборы реагентов: «АмплиСенс® ВПЧ высокого канцерогенного риска генотип-FL» для отдельного определения ДНК

ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59-го типов; «АмплиСенс® ВПЧ высокого канцерогенного риска скрин-титр-FL» для количественного определения ДНК ВПЧ 12 типов, относящихся к филогенетическим группам А9 (16, 31, 33, 35, 52, 58-й типы), А7 (18, 39, 45, 59-й типы), А5/А6 (51-й и 56-й генотипы); «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» для дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ 16-го и 18-го типов; «АмплиСенс® ВПЧ 6/11-FL» для выявления и дифференциации ДНК ВПЧ низкого канцерогенного риска 6-го и 11-го типов. Во всех указанных наборах используется эндогенный внутренний контроль (участок ДНК гена β-глобина). Результат учитывали при его количестве не менее 1000 копий/реакцию. При расчете вирусной нагрузки проводили нормализацию показателей на 100 тыс. копий гена β-глобина. Одновременное использование наборов реагентов с различными мишенями (участки гена *E1-E2* или гена *E6*) позволило нам косвенно судить о наличии интегрированной в геном или эписомальной формы вируса. Наличие флуоресцентного сигнала только в наборе реагентов «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» свидетельствовало о присутствии вируса в интегрированной форме (100 % интеграции). В случае появления флуоресцентного сигнала в 2 наборах проводили дополнительное исследование с использованием набора реагентов, разработанного Центральным НИИ эпидемиологии. Степень интеграции ВПЧ 16-го или 18-го типа, обнаруженных в моноварианте, оценивали по соотношению числа копий генов *E2* и *E6*: $(1-E2/E6) \times 100 \%$, где *E2* – число копий гена *E2*; *E6* – число копий гена *E6*.

Исследовано 57 образцов FFPE ткани от больных с диагнозом РЭ в возрасте 47–78 лет, из них 10 женщин (возраст до 55 лет) находились в периоде перименопаузы, 39 (56–75 лет) – постменопаузы, 8 (старше 76 лет) – глубокой менопаузы. По морфологическим признакам 13 (22,8 %) опухолей относились к серозно-папиллярной аденокарциноме, 44 (77,2 %) – к эндометриальной аденокарциноме (12 (27,3 %) из них имели очаги плоскоклеточной дифференцировки). С учетом того, что ВПЧ поражает преимущественно плоский эпителий, мы сгруппировали исследуемые образцы по следующему принципу: 1-ю группу составили эндометриальные аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой ($n = 12$), 2-ю – серозно-папиллярные и эндометриальные аденокарциномы без плоскоклеточной дифференцировки ($n = 45$). У 38 (66,7 %) женщин установлена I стадия заболевания, в том числе у 32 (71,7 %) с аденокарциномой без плоскоклеточной дифференцировки и у 6 (50,0 %) с ее наличием; у 4 (7,0 %) пациенток – II стадия, в том числе у 2 (4,4 %) без плоскоклеточной дифференцировки и у 2 (16,7 %) с ее наличием; у 13 (22,8 %) женщин – III стадия, в том числе у 9 (20,0 %) без плоскоклеточной дифференцировки и у 4 (33,3 %) с ее наличием; у 2 (3,5 %) пациенток – IV стадия, у 2 (4,4 %) без плоскоклеточной дифференцировки и у 0 % с ее наличием.

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с общепринятыми методами [8] с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel и программного пакета Statistica 10.0. Для сравнения качественных признаков выборок применяли χ^2 -критерий Пирсона; если хотя бы одно из значений ожидаемого явления было меньше 10, для анализа использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$; при уровне значимости $0,05 \leq p < 0,1$ отмечали тенденцию к достоверности.

Результаты

При исследовании FFPE ткани ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска обнаружена у 54,4 % больных, 45,6 % образцов были ВПЧ-отрицательными. Таким образом, установлен высокий уровень ВПЧ-инфицирования ткани опухоли при РЭ.

Среди женщин перименопаузального периода 6 (60,0 %) пациенток имели ВПЧ-положительный статус опухоли, 4 (40,0 %) – ВПЧ-отрицательный, постменопаузального периода – 21 (53,8 %) и 18 (46,2 %) пациенток соответственно. Несмотря на преобладание ВПЧ-положительных образцов, различия не были статистически значимыми ($p > 0,05$). В группе женщин в период глубокой менопаузы количество ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных было равным (по 50,0 %).

Нами выявлены достоверные различия в частоте ВПЧ-инфицирования ткани различного гистологического типа. Так, образцы с плоскоклеточной дифференцировкой в 1,8 раза чаще были ВПЧ-положительными, чем ткани аденокарциномы без нее (83,3 % против 46,7 %; $p = 0,0237$) (табл. 1). Среди серозно-папиллярных аденокарцином преобладали ВПЧ-положительные (53,8 %), а среди эндометриальных без плоскоклеточной дифференцировки, напротив, ВПЧ-отрицательные (56,3 %), однако достоверной зависимости статуса ВПЧ-инфицирования от гистологического подтипа аденокарцином без плоскоклеточной дифференцировки не установлено ($p > 0,05$) (табл. 2).

Среди опухолей с высокой степенью дифференцировки были только ВПЧ-отрицательные, в группах умеренно и низкодифференцированных преобладали опухоли с ВПЧ-положительным статусом, причем в группе низкодифференцированных опухолей это преобладание выражено значительно сильнее (см. табл. 1). Удельный вес ВПЧ-положительных образцов среди умеренно дифференцированных опухолей составил 55,6 %, среди низкодифференцированных – 73,3 %, а соотношение ВПЧ-положительных образцов к ВПЧ-отрицательным составило 1,25 и 2,75 соответственно. Таким образом, в ходе исследования мы установили, что со снижением степени дифференцировки опухоли достоверно увеличивалась частота ВПЧ-инфицированных образцов ($p = 0,01$). Данная закономерность сохранялась только для опухолей без плоскоклеточной

дифференцировки. В этой группе высокодифференцированные опухоли были только ВПЧ-отрицательными, умеренно дифференцированные – преимущественно ВПЧ-отрицательными (57,1 %), а низкодифференцированные, напротив, – ВПЧ-положительными (81,8 %). Таким образом, при аденокарциномах без плоскоклеточной метаплазии по мере снижения степени дифференцировки опухоли повышался удельный вес образцов с положительным ВПЧ-статусом ($p = 0,005$). Эта закономерность была сформирована за счет серозно-папиллярных аденокарцином ($p = 0,002$); при эндометриальных аденокарциномах без плоскоклеточной метаплазии степень дифференцировки не зависела от ВПЧ-статуса опухоли. При сравнении частоты выявления ДНК ВПЧ у женщин с разными гистологическими подтипами РЭ и одной степенью дифференцировки нами обнаружена тенденция к преобладанию ВПЧ-положительных эндометриальных аденокарцином без плоскоклеточной метаплазии по сравнению с серозно-папиллярными ($p = 0,089$), но только среди умеренно дифференцированных опухолей. Эндометриальные аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой имели противоположные характеристики. Высокодифференцированного рака не было ни среди ВПЧ-положительных, ни среди ВПЧ-отрицательных, умеренно дифференцированный рак регистрировался только среди ВПЧ-положительных, а при низкодифференцированном раке удельный вес образцов с различным ВПЧ-статусом был равным (см. табл. 1). При аденокарциномах с плоскоклеточной метаплазией установлена тенденция к уменьшению частоты выявления ДНК ВПЧ со снижением степени дифференцировки между умеренно дифференцированными и низкодифференцированными опухолями ($p = 0,091$).

Одним из свойств злокачественности, приводящих к летальному исходу, является метастазирование. Статистически значимой разницы между опухолями с разным ВПЧ-статусом в общей когорте не выявлено ($p > 0,05$). Отдаленные метастазы обнаружены только среди больных с ВПЧ-положительными серозно-папиллярными аденокарциномами. Частота выявления регионарных метастазов в общей когорте обследованных также не зависела от ВПЧ-статуса опухоли ($p > 0,05$). Метастазы в лимфатических узлах или придатках матки регистрировались только у больных без плоскоклеточной дифференцировки, при этом нами установлена лишь тенденция к преобладанию частоты регионарного метастазирования ВПЧ-положительных опухолей над ВПЧ-отрицательными ($p = 0,083$). При аденокарциномах с плоскоклеточной дифференцировкой были зарегистрированы только больные без метастазов, из них 83,3 % имели ВПЧ-положительный статус опухоли.

В общей когорте обследованных среди больных с I стадией преобладали ВПЧ-отрицательные (57,9 %), со II–IV стадиями – ВПЧ-положительные (100, 69,2 и 100 % соответственно). Нами установлены статистически

Таблица 1. Частота выявления ВПЧ в ткани опухоли при раке эндометрия в зависимости от клинико-морфологических характеристик

Table 1. Frequency of HPV detection in endometrial tumor tissue depending on clinical and morphological characteristics

| Характеристика Characteristic | Всего Total | | | Эндометриальные без плоскоклеточной дифференцировки и серозно-папиллярные аденокарциномы Endometrial without squamous cell differentiation and serous papillary adenocarcinomas | | | Эндометриальные аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой Endometrial adenocarcinomas with squamous cell differentiation | | |
|--|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | n | ВПЧ (+), n (%) HPV (+), n (%) | ВПЧ (-), n (%) HPV (-), n (%) | n | ВПЧ (+), n (%) HPV (+), n (%) | ВПЧ (-), n (%) HPV (-), n (%) | n | ВПЧ (+), n (%) HPV (+), n (%) | ВПЧ (-), n (%) HPV (-), n (%) |
| Всего Total | 57 | 31 (54,4) | 26 (45,6) | 45 | 21 (46,7)** | 24 (53,3) | 12 | 10 (83,3)** | 2 (16,7) |
| Степень дифференцировки: Differentiation grade: | | | | | | | | | |
| G ₁ | 6 | 0 | 6 (100) | 6 | 0 | 6 (100) | 0 | 0 | 0 |
| G ₂ | 36 | 20 (55,6)* | 16 (44,4) | 28 | 12 (42,9)* | 16 (57,1) | 8 | 8 (100) | 0 |
| G ₃ | 15 | 11 (73,3)* | 4 (26,7) | 11 | 9 (81,8)* | 2 (18,2) | 4 | 2 (50,0) | 2 (50,0) |
| Наличие метастазов: Metastatic status: | | | | | | | | | |
| N0 | 49 | 25 (51,0) | 24 (49,0) | 37 | 15 (40,5) | 22 (59,5) | 12 | 10 (83,3) | 2 (16,7) |
| Nx | 8 | 6 (77,8) | 2 (22,2) | 8 | 6 (75,0) | 2 (25,0) | 0 | 0 | 0 |
| M0 | 55 | 29 (52,7) | 26 (47,3) | 43 | 19 (44,2) | 24 (55,8) | 12 | 10 (83,3) | 2 (16,7) |
| M1 | 2 | 2 (100) | 0 | 2 | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Стадия: Stage: | | | | | | | | | |
| I, в том числе: I, including: | 38 | 16 (42,0)* | 22 (57,9) | 32 | 10 (31,3)*, ** | 22 (68,7) | 6 | 6 (100)** | 0 |
| IA | 16 | 10 (62,5)* | 6 (37,5) | 14 | 8 (57,1)* | 6 (42,9) | 2 | 2 (100) | 0 |
| IB | 22 | 6 (27,3)* | 16 (72,7) | 18 | 2 (11,1)*, ** | 16 (88,9) | 4 | 4 (100)** | 0 |
| II | 4 | 4 (100)* | 0 | 2 | 2 (100) | 0 | 2 | 2 (100) | 0 |
| III | 13 | 9 (69,2) | 4 (30,8) | 9 | 7 (77,8)* | 2 (22,2) | 4 | 2 (50,0) | 2 (50,0) |
| IV | 2 | 2 (100) | 0 | 2 | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Тип роста опухоли: Tumor growth type: | | | | | | | | | |
| экзофитный exophytic | 12 | 6 (50,0)* | 6 (50,0) | 10 | 4 (40,0)* | 6 (60,0) | 2 | 2 (100) | 0 |
| инфильтративный infiltrative | 15 | 13 (86,7)* | 2 (13,3) | 13 | 11 (84,6)* | 2 (15,4) | 2 | 2 (100) | 0 |
| смешанный mixed | 30 | 12 (40,0)* | 18 (60,0) | 22 | 6 (27,3)*, ** | 16 (72,7) | 8 | 6 (75,0)** | 2 (25,0) |
| Глубина инвазии: Invasion depth: | | | | | | | | | |
| <1/2 | 18 | 12 (66,7) | 6 (33,3) | 16 | 10 (62,5) | 6 (37,5) | 2 | 2 (100) | 0 |
| >1/2 | 30 | 14 (46,7) | 16 (53,3) | 24 | 8 (33,3)** | 16 (66,7) | 6 | 6 (100)** | 0 |
| до серозы up to serosa | 9 | 5 (55,6) | 4 (44,4) | 5 | 3 (60,0) | 2 (40,0) | 4 | 2 (50,0) | 2 (50,0) |

Примечание. Здесь и в табл. 2: ВПЧ – вирус папилломы человека; n – количество исследованных образцов.

Note. Here and in Table 2: HPV – human papillomavirus; n – number of examined samples.

*Достоверные различия между параметрами анализа. **Достоверные различия между гистологическими типами.

*Significant differences between the analytic parameters. **Significant differences between histological types.

значимое увеличение ВПЧ-положительных опухолей со II стадией по сравнению с I (100 % против 42,1 %; $p = 0,043$) и тенденция к росту в III стадии по сравнению с I (69,2 % против 42,1 %; $p = 0,085$). Интересно, что

при сравнении частоты выявления ВПЧ-положительных опухолей при стадиях IA и IB обнаружена статистически значимая, но обратная закономерность: при стадии IA ВПЧ-положительные опухоли регистрировались

достоверно чаще, чем при IB (62,5 % против 27,3 %; $p = 0,032$).

В группе опухолей без плоскоклеточной дифференцировки также наименьший удельный вес ВПЧ-положительных образцов был при I стадии заболевания, однако статистически значимыми были различия только между I и III стадиями ($p = 0,017$). Как и в об-

щей группе, частота выявления ВПЧ-положительных образцов при стадии IA (57,1 %) достоверно превышала тот же показатель при стадии IB (11,1 %) при уровне значимости $p = 0,032$. Однако при анализе отдельных гистологических подтипов аденокарцином эндометрия без плоскоклеточной дифференцировки мы не смогли установить статистически значимой взаимосвязи ВПЧ-

Таблица 2. Частота выявления ВПЧ в ткани эндометриальных без плоскоклеточной дифференцировки и серозно-папиллярных аденокарцином в зависимости от морфологических и клинических характеристик опухоли

Table 2. Frequency of HPV detection in endometrial adenocarcinomas without squamous cell differentiation and serous papillary adenocarcinomas depending on morphological and clinical characteristics of the tumor

| Характеристика Characteristic | Всего Total | | | Серозно-папиллярная аденокарцинома Serous papillary adenocarcinoma | | | Эндометриальная аденокарцинома без плоскоклеточной дифференцировки Endometrial adenocarcinoma without squamous cell differentiation | | |
|--|----------------|-------------------|-------------------|--|-------------------|-------------------|--|-------------------|-------------------|
| | n | ВПЧ (+), n (%) | ВПЧ (-), n (%) | n | ВПЧ (+), n (%) | ВПЧ (-), n (%) | n | ВПЧ (+), n (%) | ВПЧ (-), n (%) |
| | | HPV (+), n (%) | HPV (-), n (%) | | HPV (+), n (%) | HPV (-), n (%) | | HPV (+), n (%) | HPV (-), n (%) |
| Всего Total | 45 | 21 (46,7) | 24 (53,3) | 13 | 7 (53,8) | 6 (46,2) | 32 | 14 (43,7) | 18 (56,3) |
| Степень дифференцировки: Differentiation grade: | | | | | | | | | |
| G ₁ | 6 | 0 | 6 (100) | 2 | 0* | 2 (100) | 4 | 0 | 4 (100) |
| G ₂ | 28 | 12 (42,9)* | 16 (57,1) | 4 | 0*. ** | 4 (100) | 24 | 12 (50,0)** | 12 (50,0) |
| G ₃ | 11 | 9 (81,8)* | 2 (18,2) | 7 | 7 (100)* | 0 | 4 | 2 (50,0) | 2 (50,0) |
| Наличие метастазов: Metastatic status: | | | | | | | | | |
| N0 | 37 | 15 (40,5) | 22 (59,5) | 7 | 3 (42,9) | 4 (57,1) | 30 | 12 (40,0) | 18 (60,0) |
| Nx | 8 | 6 (75,0) | 2 (25,0) | 6 | 4 (66,7) | 2 (33,3) | 2 | 2 (100) | 0 |
| M0 | 43 | 19 (44,2) | 24 (55,8) | 11 | 5 (45,5) | 6 (54,5) | 32 | 14 (43,7) | 18 (56,3) |
| M1 | 2 | 2 (100) | 0 | 2 | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Стадия: Stage: | | | | | | | | | |
| I, в том числе: I, including: | 32 | 10 (31,3)* | 22 (68,7) | 6 | 2 (33,3) | 4 (66,7) | 26 | 8 (30,8) | 18 (69,2) |
| IA | 14 | 8 (57,1)* | 6 (42,9) | 0 | 0 | 0 | 14 | 8 (57,1) | 6 (42,9) |
| IB | 18 | 2 (11,1)* | 16 (88,9) | 6 | 2 (33,3) | 4 (100) | 12 | 0 | 12 (100) |
| II | 2 | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 (100) | 0 |
| III | 9 | 7 (77,8)* | 2 (22,2) | 5 | 3 (60,0) | 2 (40,0) | 4 | 4 (100) | 0 |
| IV | 2 | 2 (100) | 0 | 2 | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Тип роста опухоли: Tumor growth type: | | | | | | | | | |
| экзофитный exophytic | 10 | 4 (40,0)* | 6 (60,0) | 0 | 0 | 0 | 10 | 4 (40,0) | 6 (60,0) |
| инфильтративный infiltrative | 13 | 11 (84,6)* | 2 (15,4) | 5 | 5 (100)** | 0 | 8 | 6 (75,0)** | 2 (25,0) |
| смешанный mixed | 22 | 6 (27,3)* | 16 (72,7) | 8 | 2 (25,0)** | 6 (75,0) | 14 | 4 (28,6)** | 10 (71,4) |
| Глубина инвазии: Invasion depth: | | | | | | | | | |
| <1/2 | 16 | 10 (62,5) | 6 (37,5) | 0 | 0 | 0 | 16 | 10 (62,5) | 6 (37,5) |
| >1/2 | 24 | 8 (33,3) | 16 (66,7) | 10 | 6 (60,0)** | 4 (40,0) | 14 | 2 (14,3)** | 12 (85,7) |
| до серозы up to serosa | 5 | 3 (60,0) | 2 (40,0) | 3 | 0 | 3 (100) | 2 | 2 (100) | 0 |

*Достоверные различия между параметрами анализа. **Достоверные различия между гистологическими типами.

*Significant differences between analytic parameters. **Significant differences between histological types.

статуса опухоли со стадией заболевания. Указанные закономерности формировались только при объединении образцов разных гистологических подтипов в группы. Попытка выявить различия в частоте регистрации ВПЧ-положительных опухолей разного гистогенеза в пределах одной стадии заболевания также не выявила четких закономерностей. Установлено лишь статистически значимое преобладание ВПЧ-положительных опухолей среди аденокарцином с плоскоклеточной дифференцировкой (100 %) по сравнению с аденокарциномами без нее (31,3 %) в I стадии заболевания ($p = 0,0029$), в том числе в стадии IV (100 и 11,1 %; $p = 0,0021$).

Стадия заболевания при РЭ в первую очередь определяется глубиной инвазии. В ходе проведенного исследования в общей группе и среди аденокарцином без плоскоклеточной метаплазии нам не удалось установить достоверную зависимость частоты выявления ДНК ВПЧ от глубины инвазии опухоли ($p > 0,05$). Среди больных с плоскоклеточной дифференцировкой опухоли определена тенденция к достоверному снижению частоты ВПЧ-положительных опухолей в зависимости от глубины инвазии ($p = 0,091$). Также мы установили, что при глубине инвазии $> 1/2$ миометрия ВПЧ-положительными достоверно чаще были опухоли с плоскоклеточной дифференцировкой (100 %) по сравнению с опухолями без нее (33,3 %), а серозно-папиллярные (60,0 %) по сравнению с эндометриальными (14,3 %) при уровнях значимости $p = 0,0051$ и $0,0283$ соответственно.

Большая часть опухолей характеризовалась смешанным типом роста. В общей группе исследуемых образцов к смешанному типу относились 30 (52,6 %) образцов, к инфильтративному – 15 (26,3 %), к экзофитному – 12 (21,1 %). Аденокарциномы без плоскоклеточной дифференцировки со смешанным типом роста встречались в 22 (48,8 %) наблюдениях, в том числе серозно-папиллярные – в 8 (61,5 %), эндометриальные – в 14 (43,7 %), с инфильтративным типом роста – в 13 (28,9 %), 5 (38,5 %) и 8 (25,0 %), с экзофитным – в 10 (22,2 %), 0 % и 10 (31,3 %) соответственно. В опухолях с плоскоклеточной дифференцировкой смешанный тип роста встречался в 8 (66,6 %) наблюдениях, инфильтративный – в 2 (16,7 %) и экзофитный – в 2 (16,7 %).

ВПЧ-положительными чаще были опухоли с инфильтративным типом роста (см. табл. 1, 2). В общей группе исследованных образцов среди опухолей с этим типом роста ДНК ВПЧ обнаружена у 86,7 %, с экзофитным – у 50,0 %, со смешанным – у 40,0 %, т. е. среди опухолей с инфильтративным ростом ВПЧ-положительные встречались в 1,7 раза чаще, чем с экзофитным, и в 2,2 раза чаще, чем со смешанным. Разница была достоверна при уровне значимости $p = 0,049$ для соотношения инфильтративный/экзофитный и $p = 0,003$ для соотношения инфильтративный/смешанный. Для аденокарцином без плоскоклеточной дифференциров-

ки установлены аналогичные закономерности. ДНК ВПЧ достоверно чаще была выявлена в опухолях с инфильтративным типом роста, чем с экзофитным (84,6 % против 40,0 %; $p = 0,036$) и смешанным (84,6 % против 27,3 %; $p = 0,014$) типами роста. При раздельном анализе по гистологическим подтипам мы определили достоверное преобладание ВПЧ-положительных над ВПЧ-отрицательными только для соотношения инфильтративный/смешанный рост при серозно-папиллярных (100 % против 25,0 %; $p = 0,016$) и эндометриальных (75,0 % против 28,6 %; $p = 0,048$) аденокарциномах без плоскоклеточной дифференцировки. Для опухолей с плоскоклеточной дифференцировкой подобные закономерности не выявлены ($p > 0,05$). При смешанном типе роста ВПЧ-положительный статус достоверно чаще был отмечен у опухолей с плоскоклеточной дифференцировкой (75,0 %), чем без нее (27,3 %) ($p = 0,026$). При других типах роста достоверных различий между статусом ВПЧ-инфицирования опухолей различной гистологической структуры не выявлено ($p > 0,05$).

При анализе типовой принадлежности ВПЧ-положительных образцов было установлено, что 16-й тип вируса составил 38,7 %, 18-й – 51,6 %, 35-й – 3,2 %, а сочетание 16-го и 18-го – 6,5 % в общей структуре образцов. Среди пациентов с эндометриальной без плоскоклеточной дифференцировки и серозно-папиллярной аденокарциномами эти показатели составили 19,0; 66,7; 4,8 и 9,5 % соответственно. При аденокарциноме с плоскоклеточной дифференцировкой обнаружены только 16-й и 18-й типы и они составили 80,0 и 20,0 % соответственно, т. е. в образцах с плоскоклеточной дифференцировкой достоверно чаще встречался 16-й тип, а без нее – 18-й тип ВПЧ ($p = 0,005$). Серозно-папиллярные аденокарциномы отличались от эндометриальных наличием сочетанных вариантов и 35-го типа вируса. ДНК ни одного из других определяемых типов ВПЧ высокого канцерогенного риска, а также низкого риска 6-го/11-го типов ни в одном случае не обнаружена.

Интеграция генома ВПЧ в геном инфицированной клетки является важным событием в процессе ее злокачественной трансформации и ведет к потере большей части вирусного генома, но при этом не сопровождается потерей генов *E6* и *E7* [9]. При анализе физической формы вируса, выявленного в моноварианте, мы установили, что 16-й тип ВПЧ был обнаружен только в тест-системах с мишенью в области гена *E6*, т. е. во всех случаях произошла 100 % интеграция вируса в геном клетки. Для 18-го типа ВПЧ 100 % интеграция была выявлена только в 87,5 % образцов, в 2 (12,5 %) образцах положительный сигнал был получен в тест-системах с мишенью в области генов *E6* и *E2*, уровень интеграции ВПЧ в этих образцах составил 72 и 75 % соответственно. Только в эписомальной форме ни один генотип ВПЧ не обнаружен. Уровень вирусной нагрузки был вариабелен и в среднем составил для 16-го типа 1,6 lg копий/ 10^5 клеток, для 18-го типа – 2,4 lg копий/ 10^5 клеток.

Таким образом, в ходе исследования отмечено, что в зависимости от гистологической структуры отличалась не только частота ВПЧ-инфицирования тканей опухоли, различными были и преобладающие генотипы вируса. Так, при аденокарциноме с плоскоклеточной дифференцировкой ткань опухоли чаще была инфицирована 16-м типом, а без нее — 18-м; вирусная нагрузка не была высокой.

Обсуждение

В нашем исследовании был установлен высокий уровень (54,4 %) ВПЧ-инфицирования ткани опухоли при РЭ. Наиболее значительным международным исследованием в этом направлении является работа группы ученых, в которой были проведены систематический обзор и метаанализ распространенности ВПЧ при РЭ [7]. Авторы показали, что распространенность ВПЧ при РЭ значительно варьировала — от 0 до 61,1 %. Показатель распространенности ВПЧ статистически значимо ($p = 0,0016$) был связан с методом исследования: значительно ниже он был при использовании методов, не основанных на ПЦР. При использовании методов на основе ПЦР распространенность ВПЧ при РЭ достоверно ниже была в случаях применения общих праймеров по сравнению с типоспецифическими. Ни один из других анализируемых факторов (географический регион, тип ткани, год публикации) статистически значимо не ассоциировался с распространенностью ВПЧ. Объединенный относительный риск составил 1,43 (95 % доверительный интервал 0,68–3,00), т. е. вероятность инфекции ВПЧ не увеличивалась по сравнению с контролем [7]. В работе Н.А. Бабаевой отмечено лишь 11,7 % ВПЧ-положительных тканей опухоли при РЭ и для выявления ДНК ВПЧ использован метод Digene Hybrid Capture II [6]. По результатам многочисленных международных исследований этот метод признан «золотым стандартом» для выявления ВПЧ при проведении цервикального скрининга, так как позволяет обнаружить лишь клинически значимую концентрацию вируса (более 10^5 копий/мл). В нашем исследовании для выявления ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска был применен метод ПЦР в реальном времени, позволяющий определить любое количество вируса. Уровень вирусной нагрузки в нашем исследовании не превышал $3,0 \lg$ копий/ 10^5 клеток. Если использовать критерии оценки клинической значимости, разработанные для цервикального скрининга в целях определения прогноза развития РШМ, эту величину можно считать клинически малозначимой. Однако правомерность механического переноса критериев оценки клинической значимости результатов исследований цервикальных мазков на данные, полученные при исследовании FFPE ткани, при РЭ остается под вопросом.

В настоящей работе основной акцент сделан на изучении взаимосвязи ВПЧ-статуса опухоли с ее морфо-

логическими характеристиками. Аналогичный подход был использован и другими исследователями, однако авторы не выявили корреляции статуса ВПЧ-инфицирования с наличием плоскоклеточной дифференцировки, глубиной инвазии миометрия, поражением лимфатической системы, лимфоцитарным ответом, возрастом пациентов или прогнозом [4, 5]. Нам также не удалось установить ассоциации ВПЧ-статуса опухоли с возрастом и наличием регионарных или отдаленных метастазов. Что касается таких во многом взаимосвязанных параметров, как стадия заболевания и глубина инвазии, мы получили неоднозначные результаты. С одной стороны, в общей когорте обследованных женщин ВПЧ-положительные опухоли статистически значимо чаще были выявлены во II стадии по сравнению с I, а среди больных с наличием плоскоклеточной дифференцировки — в III стадии по сравнению с I. С другой стороны, в обеих группах ВПЧ-положительными статистически значимо чаще были более поверхностные опухоли (чаще в стадии IA, чем в IB). В отношении глубины инвазии статистически значимые закономерности были определены лишь при инвазии $>1/2$ миометрия.

В то же время в нашем исследовании установлена достоверная взаимосвязь статуса ВПЧ-инфицирования с рядом морфологических характеристик опухоли: гистологическим типом (аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой в 1,8 раза чаще были ВПЧ-положительными, чем без нее, в первом случае ткани опухоли чаще были инфицированы 16-м типом ВПЧ, во втором — 18-м), степенью дифференцировки (в общей когорте и при серозно-папиллярных аденокарциномах со снижением степени дифференцировки опухоли достоверно увеличивалась частота ВПЧ-инфицированных образцов), типом роста опухоли (среди опухолей с инфильтративным ростом ВПЧ-положительные встречались в 1,7 раза чаще, чем с экзофитным, и в 2,2 раза чаще, чем со смешанным).

С учетом того, что аденокарциномы эндометриального происхождения являются преимущественно ВПЧ-отрицательными, а эндоцервикального, напротив, ВПЧ-положительными, ряд авторов считают полезным использование теста на ВПЧ в случаях, когда сложно определить происхождение опухоли [10–12].

Заключение

В ходе проведенного исследования установлен значительный уровень (54,4 %) распространенности 16-го и 18-го типов ВПЧ при РЭ у больных, проживающих на Юге России. Нами определена статистически значимая взаимосвязь статуса ВПЧ-инфицирования с отдельными клинико-морфологическими характеристиками опухоли (наличием плоскоклеточной метаплазии, степенью дифференцировки, типом роста опухоли). Это дает основание для более глубокого изучения вопроса о роли ВПЧ в развитии РЭ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Костин А.А., Старинский В.В., Самсонов Ю.В., Асратов А.Т. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях, ассоциированных с вирусом папилломы человека. Исследования и практика в медицине 2016;3(1):66–78. [Kostin A.A., Starinskiy V.V., Samsonov Yu.V., Asratov A.T. The analysis of statistical data on malignant neoplasms associated with human papillomavirus. Issledovaniya i praktika v meditsine = Research and Practice in Medicine 2016;3(1):66–78. (In Russ.)].
3. A review of human carcinogens. B. Biological agents. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 100(B). 2012. 485 p.
4. Giatromanolaki A., Sivridis E., Papazoglou D. et al. Human papillomavirus in endometrial adenocarcinomas: infectious agent or a mere “passenger”? *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007;2007:60549. DOI: 10.1155/2007/60549. PMID: 18274613.
5. Fedrizzi E.N., Villa L.L., de Souza I.V. et al. Does human papillomavirus play a role in endometrial carcinogenesis? *Int J Gynecol Pathol* 2009;28(4):322–7. DOI: 10.1097/PGP.0b013e318199943b. PMID: 19483634.
6. Бабаева Н.А. Гормональный и инфекционный факторы канцерогенеза органов женской репродуктивной системы. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2013 [Babaeva N.A. Hormonal and infectious factors of carcinogenesis of organs of the female reproductive system. Thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 2013. (In Russ.)].
7. Olesen T.B., Svahn M.F., Faber M.T. et al. Prevalence of Human Papillomavirus in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2014;134(1):206–15. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.02.040. PMID: 24607284.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с. [Glantz S. Primer of biostatistics. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. (In Russ.)].
9. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50. DOI: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.
10. Jiang L., Malpica A., Deavers M.T. et al. Endometrial endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus involving the cervix: some cases probably represent independent primaries. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29(2):146–56. DOI: 10.1097/PGP.0b013e3181b8e951. PMID: 20173500.
11. Jones M.W., Onisko A., Dabbs D.J. et al. Immunohistochemistry and HPV in situ hybridization in pathologic distinction between endocervical and endometrial adenocarcinoma: a comparative tissue microarray study of 76 tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(2):380–4. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31825cc8ee. PMID: 23318908.
12. Malpica A. How to approach the many faces of endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 2016;29 Suppl 1: S29–44. DOI: 10.1038/modpathol.2015.142. PMID: 26715172.

Вклад авторов

Т.А. Зыкова: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 Т.И. Моисеенко: анализ данных, редактирование рукописи;
 Е.М. Франциянц: разработка дизайна исследования;
 М.А. Вовкочина: сбор данных для исследования, первичный анализ.

Authors' contributions

T.A. Zyкова: reviewing of publications of the article's theme, article writing;
 T.I. Moiseenko T.I.: analysis of the data, article editing;
 E.M. Frantsiyants: developing the research design;
 M.A. Vovkochina: data accumulation for the study.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Зыкова/T.A. Zyкова: <http://orcid.org/0000-0001-5345-4872>
 Т.И. Моисеенко/T.I. Moiseenko: <http://orcid.org/0000-0003-4037-7649>
 Е.М. Франциянц/E.M. Frantsiyants: <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>
 М.А. Вовкочина/M.A. Vovkochina: <http://orcid.org/0000-0002-4901-250X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 21.05.2018. **Принята к публикации:** 14.08.2018.

Article received: 21.05.2018. **Accepted for publication:** 14.08.2018.

Способность к формированию дуплексов как фактор внутриклеточного распределения микроРНК

С.А. Кузьмичев^{1,2}, А.В. Комельков¹, Е.М. Чевкина¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, ул. Дедегатская, 20, стр. 1

Контакты: Сергей Александрович Кузьмичев kuzs2005@mail.ru

Введение. Регуляция содержания зрелых микроРНК (миРНК) в различных компартментах клетки – ядре (N) и цитоплазме (C) – позволяет контролировать возможность их участия в процессах РНК-опосредованной интерференции. Различные по структуре миРНК, процессинг которых осуществляется с разных предшественников (пре-миРНК), могут образовывать дуплексы между молекулами при наличии в них комплементарных последовательностей. Формирование таких дуплексов может рассматриваться как один из механизмов регуляции активности миРНК в отношении их целевых матричных РНК (мРНК).

Цель исследования – анализ распределения различных миРНК между ядром и цитоплазмой в зависимости от энергии образования дуплексов.

Материалы и методы. Материалом для исследований послужили данные о содержании различных миРНК в ядре и цитоплазме в клетках 2 линий различного происхождения: 5-8F назофарингеальной карциномы (nasopharyngeal carcinoma, NPC) человека и постмитотических нейронов коры головного мозга серой крысы. Последовательности миРНК, используемые для анализа, были взяты из базы данных miRBase, версия 22. Биоинформатический анализ последовательностей миРНК для выявления молекул, способных образовывать дуплексы миРНК, и определения минимальной свободной энергии (minimum free energy, MFE) их формирования проводили с помощью программ RegRNA, версия 2.0, и RNAup.

Результаты. Впервые проведен сравнительный анализ внутриклеточного распределения (соотношение N/C) различных миРНК в зависимости от энергии образования дуплексов. Результаты биоинформатического анализа данных секвенирования миРНК в клетках линии 5-8F NPC показали, что миРНК, способные образовывать высокоэнергетические, т. е. более стабильные, дуплексы, накапливаются в цитоплазме, в то время как низкоэнергетические дуплексы в клетках данной линии накапливаются в ядре (имеют большее значение N/C). Также показано отсутствие зависимости распределения N/C от ряда коротких мотивов, предположительно ассоциированных с ядерной локализацией для миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы.

Заключение. Выявленное обогащение пула цитоплазматических миРНК молекулами, способными образовывать более энергетически стабильные дуплексы, может представлять дополнительный механизм регуляции активности миРНК в отношении их целевых мРНК (за счет секвестирования миРНК в цитоплазме в составе дуплексов, препятствующих взаимодействию миРНК с мРНК).

Ключевые слова: микроРНК, дуплекс миРНК, минимальная свободная энергия, внутриклеточная локализация

Для цитирования: Кузьмичев С.А., Комельков А.В., Чевкина Е.М. Способность к формированию дуплексов как фактор внутриклеточного распределения микроРНК. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):83–91.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-83-91

Ability to form duplexes as a factor of intracellular microRNA distribution

S.A. Kuzmichev^{1,2}, A.V. Komelkov¹, E.M. Tchekina¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; 20–1 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russia

Background. The regulation of the content of mature microRNAs (miRNAs) in different cell compartments – the nucleus (N) and the cytoplasm (C) – makes it possible to control their availability for participation in RNA-mediated interference processes. Structurally different miRNAs, processed from different precursors (pre-miRNA), can form duplexes between molecules containing complementary sequences. The appearance of such duplexes can be considered as one of the mechanisms of miRNA activity regulation in respect to their target mRNAs.

Objectives. Analysis of the miRNA distribution between nucleus and cytoplasm depending on the energy of duplex formation.

Materials and methods. Data on the content of different miRNAs in the nucleus and cytoplasm in two cell lines of different origin: 5-8F of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) and postmitotic neurons of the cerebral cortex of rat – has been used. The miRNA sequences used for analysis were taken from the miRBase database, version 22. Bioinformatic analysis of miRNA sequences for detection of molecules capable of forming miRNA duplexes and determination of their minimal free energy (MFE) of formation was carried out with the help of programs: RegRNA, version 2.0, and RNAup.

Results. For the first time, a comparative analysis of the intracellular distribution N/C of different miRNAs depending on the energy of duplex formation was performed. Results of bioinformatic analysis of miRNA sequencing in 5-8F cells of human nasopharyngeal carcinoma showed that miRNAs capable of forming high-energy, i. e. more stable, duplexes, accumulate in the cytoplasm, while miRNAs forming low-energy duplexes have a larger N/C value, i. e. the level of these miRNAs is higher in the nucleus. In addition, we show that N/C distribution of miRNAs capable of forming high-energy duplexes is independent from the presence of certain short motifs, that are supposedly associated with their nuclear localization.

Conclusion. The revealed enrichment of the pool of cytoplasmic miRNAs by molecules capable of forming more energetically stable duplexes may represent an additional mechanism of regulating miRNA activity in respect to their target mRNAs due to the sequestration of miRNA duplexes in the cytoplasm preventing miRNA interaction with mRNAs.

Key words: microRNA, miRNA duplex, minimal free energy, intracellular localization

For citation: Kuzmichev S.A., Komelkov A.V., Tchekina E.M. Ability to form duplexes as a factor of intracellular microRNA distribution. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):83–91.

Введение

Со времени открытия малых регуляторных РНК представления об их роли в регуляции экспрессии генов, внутриклеточной и внеклеточной сигнализации значительно расширены. Так, показано, что кроме участия в ингибировании трансляции и/или деградации матричных РНК (мРНК) в цитоплазме (С), микроРНК (миРНК) могут проникать в ядро (N) клетки и осуществлять сиквенс-специфическую регуляцию процессов транскрипции различных генов и процессинга при-миРНК – продуктов транскрипции миРНК генов [1–3].

В то же время информация, касающаяся особенностей накопления различных миРНК в ядре или цитоплазме в зависимости от их структуры, противоречива и может различаться для разных типов клеток, в том числе опухолевых [2, 4]. Механизмы отбора миРНК, участвующих в эпигенетической регуляции экспрессии генов, включают не только деградацию части зрелых молекул после их процессинга [1], транспорт в ядро [2, 3] или экскрецию из клеток [5], но и селективный подбор комплементарных последовательностей, способных образовывать дуплексы миРНК [6].

В работе использован новый подход, основанный на анализе внутриклеточного распределения миРНК между ядром и цитоплазмой (соотношение N/C) в зависимости от минимальной свободной энергии (minimum free energy, MFE) образования дуплексов. На основе результатов проведенного биоинформатического анализа выявлено различное соотношение значения N/C для миРНК в зависимости от MFE дуплекса. Полученные данные позволяют предположить существование дополнительного механизма, ограничивающего количество близких по структуре миРНК, участвующих в эпигенетической регуляции, с помощью образования высокоэнергетических и низкоэнергетических дуплексов миРНК.

Материалы и методы

Исходным материалом для исследований послужили данные о содержании различных миРНК в ядре и цитоплазме в клетках 2 линий различного происхождения: 5-8F назофарингеальной карциномы (nasopharyngeal

carcinoma, NPC) человека и постмитотических нейронов коры головного мозга серой крысы (*Rattus norvegicus*). Исходные данные ограничены 2 группами [7, 8], поскольку лишь в этих работах необходимая для анализа информация была представлена в полном объеме, включая данные последовательностей миРНК, полученные методом глубокого секвенирования, а также количественное распределение N/C молекул миРНК. Выборки составляли 158 миРНК для клеток 5-8F NPC и 123 миРНК для постмитотических нейронов коры головного мозга крысы. С использованием данных секвенирования миРНК для обоих типов клеток произведен расчет MFE и дальнейший биоинформатический анализ распределения разных миРНК между ядром и цитоплазмой.

Последовательности различных миРНК, используемые для анализа, были взяты из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org>), версия 22. Биоинформатический анализ последовательностей миРНК проводили с помощью программ RegRNA, версия 2.0 (RegRNA 2.0; <http://regna.mbc.nctu.edu.tw>), и RNAup (<http://rna.tbi.univie.ac.at>). Поиск последовательностей миРНК, способных образовывать дуплексы с другими миРНК, в программе RegRNA 2.0 выполняли с учетом следующих параметров: 1) значение MFE, которая может определяться как MFE Гиббса (ккал/моль), высвобождающаяся при формировании вторичной структуры двумя комплементарными последовательностями [9]; 2) коэффициент (Score), который оценивает возможность одновременной гибридизации наибольшего количества нуклеотидов между сравниваемыми молекулами миРНК по правилу Уотсона–Крика [9]. В том случае, когда программа RegRNA 2.0 рассчитывала возможность образования нескольких дуплексов для разных миРНК, были выбраны те пары миРНК, из молекул которых обе присутствовали в одной и той же клетке и формировали дуплексы с максимальным значением MFE (по модулю), что соответствует наибольшей вероятности возникновения дуплекса. Параметр MFE принимали одинаковым для каждой из миРНК, входящих в конкретный дуплекс. При расчете MFE с помощью программы RNAup учитывали, что пары G–U дестабилизируют структуру дуплекса и приводят

к уменьшению MFE [10]. В связи с этим при использовании программы допускалось ограничение, позволяющее избегать изолированных пар G–U при расчете MFE для дуплексов [11]. Данные экспериментальных исследований [12] показывают, что формирование дуплексов между молекулами миРНК может происходить уже при значениях MFE, равных -13 ккал/моль. В связи с этим биоинформатический анализ возможности формирования дуплексов миРНК с помощью программы RegRNA 2.0 проводили при задании значений MFE в широком диапазоне – от -25 до -10 ккал/моль и значения Score – от 80 до 170. В дальнейшем для удобства сравнения отрицательных чисел значения MFE приводятся по модулю.

Соответствие распределения N/C критерию нормальности оценивали с использованием теста Шапиро–Уилка. Различия распределения N/C для высоко- и низкоэнергетических дуплексов в сравниваемых выборках определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Статистическую обработку результатов внутриклеточного распределения миРНК, способных образовывать различающиеся по MFE дуплексы, проводили с применением программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Корреляция данных расчета параметра MFE (в ккал/моль), полученных с использованием указанных выше программ, была высокой (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,9$).

Результаты и обсуждение

Неравномерность внутриклеточного распределения миРНК, способных образовывать дуплексы. Для кор-

ректного сопоставления данных об уровне миРНК в ядре и цитоплазме в зависимости от их нуклеотидных последовательностей исследованные миРНК были разделены на 2 группы, различающиеся максимальными значениями MFE. Распределение значений параметра MFE для миРНК из клеток линии 5-8F NPC показало, что большинство миРНК имеют значения MFE в диапазоне от 10 до 19 ккал/моль, что позволяет обозначить их как молекулы, способные образовывать низкоэнергетические дуплексы, и от 24 до 37 ккал/моль, что соответствует миРНК, способным образовывать высокоэнергетические дуплексы (рис. 1). При анализе соотношения N/C для этих 2 групп выявлены статистически значимые различия ($p < 0,01$), что говорит о наличии зависимости распределения миРНК между ядром и цитоплазмой от величины MFE образования дуплексов в данных клетках (рис. 2). Группы миРНК, способные образовывать низкоэнергетические дуплексы в клетках линии 5-8F NPC, имеют большее значение N/C, т. е. уровень содержания этих миРНК в ядрах выше. Более того, для данного типа клеток обнаружена слабая, но достоверная корреляция ($r = -0,35$; $p < 0,01$) MFE с соотношением N/C во всем диапазоне значений MFE, что подтверждает наличие внутриклеточного распределения миРНК в зависимости от вероятности формирования дуплексов.

Распределение значений параметра MFE для миРНК из постмитотических нейронов коры головного мозга крысы показало, что большинство миРНК имеют значения MFE образования дуплексов в диапазоне от 12 до 16 ккал/моль, что позволяет их обозначить как

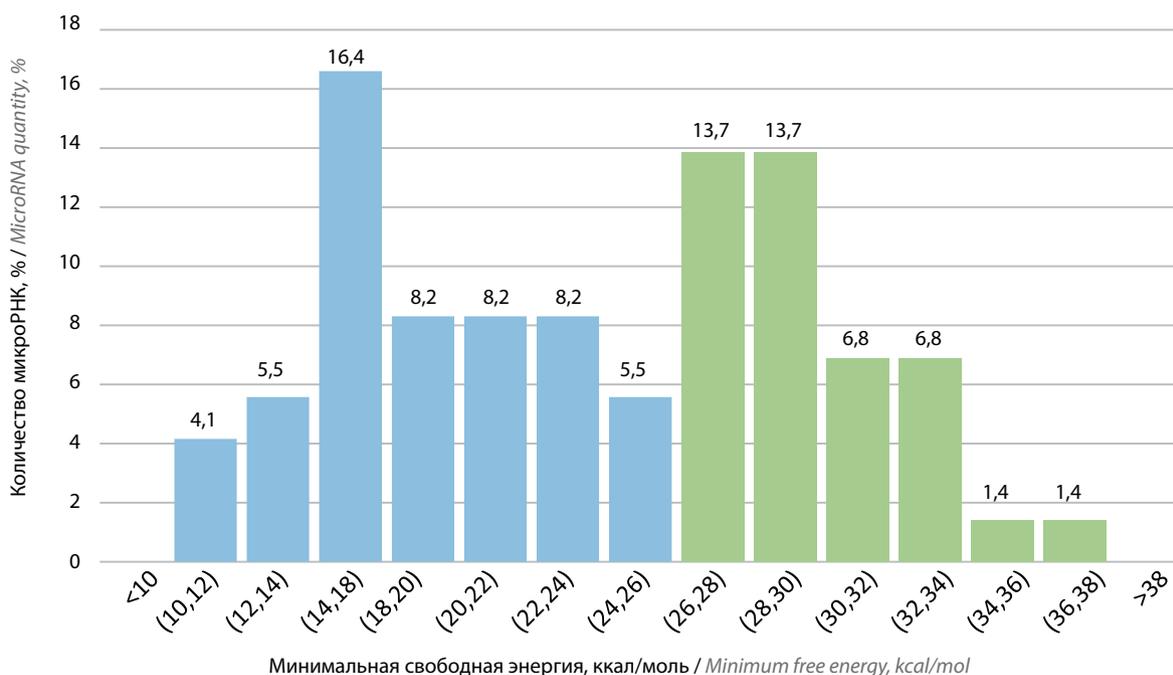


Рис. 1. Распределение значений минимальной свободной энергии образования дуплексов относительно количества микроРНК в клетках линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека

Fig. 1. Distribution of minimum free energy values of duplex formation relative to microRNA quantity in human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F

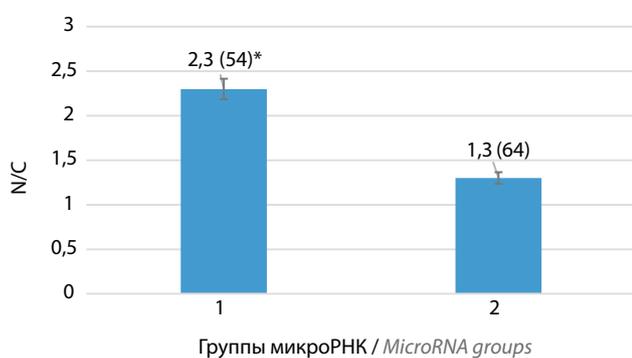


Рис. 2. Соотношение N/C для различных микроРНК клеток линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека в зависимости от способности образовывать дуплексы микроРНК. 1 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне минимальной свободной энергии 10–19 ккал/моль; 2 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне минимальной свободной энергии 24–37 ккал/моль. *Различия соотношения N/C между группами микроРНК достоверны ($p < 0,01$). В скобках указано количество молекул микроРНК в группах Fig. 2. N/C ratio for various microRNAs of human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F according to their ability to form microRNA duplexes. 1 – microRNA group capable of forming duplexes in 10–19 kcal/mol range of minimum free energy; 2 – microRNA group capable of forming duplexes in 24–37 kcal/mol range of minimum free energy. *Differences in N/C ratios between the groups are significant ($p < 0.01$). The number of microRNA molecules in the group is indicated in brackets

миРНК, способные образовывать низкоэнергетические дуплексы, и от 24 до 37 ккал/моль, что позволяет их обозначить как миРНК, способные образовывать высокоэнергетические дуплексы. Соотношения N/C для этих 2 групп миРНК не имели значимых различий ($p > 0,05$). Тем не менее имеется тенденция к снижению соотношения N/C при увеличении MFE формирования дуплексов миРНК (рис. 3).

Таким образом, полученные нами результаты показали, что 2 разных типа клеток характеризуются различным внутриклеточным распределением миРНК, способным формировать низко- и высокоэнергетические дуплексы. Для клеток линии 5-8 NPC, в отличие от постмитотических нейронов коры мозга крысы, установлена зависимость соотношения N/C для миРНК от энергии образования дуплексов миРНК.

Анализ состава миРНК с разной MFE показал, что миРНК, способные образовывать высокоэнергетические дуплексы, относятся к различным группам, в том числе к консервативному семейству let-7, семействам miR-548 и miR-17 (табл. 1, 2). Наибольшее количество дуплексов в обоих типах клеток может возникать между миРНК из семейства let-7 (см. табл. 1, 2). Объяснением этому может служить тот факт, что различные миРНК семейства let-7, образующиеся в ходе процессинга либо с 5'-, либо с 3'-конца их пре-миРНК (предшественника миРНК), имеют близкие по структуре последовательности. Они различаются на 1–4 нуклеотида и обозначаются в miRBase как let-7a, -7b, -7c, -7d, -7e, -7f, -7g, -7i. Следовательно, можно предположить, что различие в 1–4 нуклеотида между молекулами не оказывает значительного влияния на MFE

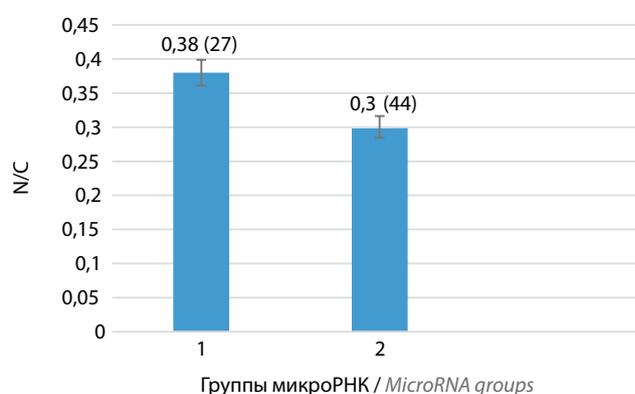


Рис. 3. Соотношение N/C для различных микроРНК постмитотических нейронов коры головного мозга серой крысы в зависимости от способности образовывать дуплексы микроРНК. 1 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне минимальной свободной энергии 12–16 ккал/моль; 2 – группа микроРНК, способная образовывать дуплексы в диапазоне MFE минимальной свободной энергии 24–37 ккал/моль Fig. 3. N/C ratio for various microRNAs of rat postmitotic cortical neurons according to their ability to form microRNA duplexes. 1 – microRNA group capable of forming duplexes in 12–16 kcal/mol range of minimum free energy; 2 – microRNA group capable of forming duplexes in 24–37 kcal/mol range of minimum free energy

образования дуплексов миРНК. Важно отметить, что дуплексы могут образовывать миРНК, процессинг которых осуществляется с предшественников, кодируемых различными геномными последовательностями.

Значительное количество дуплексов миРНК между молекулами из семейства let-7 указывает на необходимость клеточного контроля уровней этих близких по структуре молекул, что связано с их вовлечением в регуляцию многих сигнальных путей. МиРНК семейства let-7 не только участвуют в регуляции процессов пролиферации стволовых клеток, дифференцировке клеток крови при гомеопозе, но и в зависимости от клеточного окружения могут проявлять свойства онкосупрессоров или онкогенов [13, 14]. Дегградация миРНК семейства let-7 в клетках рака молочной железы может привести к прогрессии опухолевого роста [12]. МиРНК семейства let-7 осуществляют зависимую от их концентрации регуляцию уровня РНКазы Dicer, подавляя ее трансляцию, и этот механизм обратной связи может оказывать влияние на процессинг многих миРНК в разных клетках [15].

Различия в значениях параметра N/C, полученные для сравниваемых групп миРНК, могут быть обусловлены биологическими процессами, в которых участвуют эти молекулы. Так, низкоэнергетические дуплексы менее стабильны, поэтому миРНК, способные их образовывать, могут подвергаться более быстрой дегградации эндонуклеазами, как это было показано для ряда миРНК семейства let-7 в случае образования дуплексов с miR-107-5p [12]. Однако дегградация миРНК – процесс не одномоментный, и часть молекул успевает транспортироваться в ядро с помощью белков-аргонавтов [16] с участием импортина 8 [3]. В ядре миРНК могут сохраняться в течение некоторого времени, свя-

Таблица 1. Пары молекул микроРНК (миРНК), способные образовывать дуплексы с минимальной свободной энергией (MFE) 124–37 ккал/моль в клетках линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека

Table 1. MicroRNA (miRNA) molecule pairs capable of forming duplexes with minimum free energy (MFE) 124–37 kcal/mol in human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F

| миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd) | MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol | MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol | миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd) | MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol | MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| hsa-miR-1226-5p hsa-miR-675-3p | 27 | 28 | hsa-miR-125b-2-3p hsa-miR-125b-5p | 27 | 24 |
| hsa-miR-193b-3p hsa-miR-365b-5p | 28 | 27 | hsa-let-7g-5p hsa-let-7i-3p | 25 | 24 |
| hsa-let-7f-1-3p hsa-let-7a-5p | 27 | 26 | hsa-let-7b-3p hsa-let-7d-5p | 27 | 27 |
| hsa-let-7b-3p hsa-let-7e-5p | 27 | 27 | hsa-let-7c-5p hsa-let-7f-1-3p | 26 | 26 |
| hsa-let-7f-5p hsa-let-7b-3p | 25 | 24 | hsa-let-7f-5p hsa-let-7d-3p | 24 | 24 |
| hsa-let-7b-5p hsa-let-7i-3p | 27 | 27 | hsa-let-7b-5p hsa-let-7f-1-3p | 26 | 26 |
| hsa-let-7e-5p hsa-let-7c-3p | 28 | 26 | hsa-miR-29a-3p hsa-miR-29c-5p | 27 | 24 |
| hsa-miR-193a-5p hsa-miR-193b-3p | 25 | 25 | hsa-miR-106a-5p hsa-miR-106b-3p | 25 | 25 |
| hsa-miR-548h-3p hsa-miR-548d-5p | 27 | 25 | hsa-miR-548b-5p hsa-miR-548o-3p | 25 | 24 |
| hsa-miR-548o-5p hsa-miR-548h-3p | 29 | 27 | hsa-miR-548n-5p hsa-miR-548h-3p | 26 | 23 |
| hsa-miR-548o-5p hsa-miR-548p-3p | 28 | 27 | hsa-miR-193b-3p hsa-miR-365a-5p | 27 | 27 |
| hsa-miR-345-5p hsa-miR-378a-3p | 30 | 29 | hsa-let-7a-5p hsa-let-7b-3p | 32 | 31 |
| hsa-let-7c-5p hsa-let-7d-3p | 30 | 30 | hsa-let-7e-5p hsa-let-7d-3p | 29 | 29 |
| hsa-let-7a-2-3p hsa-let-7e-5p | 31 | 29 | hsa-let-7a-5p hsa-let-7d-3p | 33 | 31 |
| hsa-let-7b-5p hsa-let-7d-3p | 32 | 30 | hsa-miR-195-5p hsa-miR-16-3p | 30 | 28 |
| hsa-miR-28-3p hsa-miR-151a-5p | 37 | 35 | hsa-miR-30a-5p hsa-miR-30e-3p | 29 | 27 |
| hsa-miR-30e-3p hsa-miR-30d-5p | 29 | 27 | hsa-miR-30d-5p hsa-miR-30a-3p | 29 | 27 |
| hsa-miR-339-5p hsa-miR-23a-5p | 32 | 31 | hsa-miR-27a-5p hsa-miR-27b-3p | 25 | 25 |
| hsa-miR-17-5p hsa-miR-106b-3p | 26 | 25 | hsa-miR-29a-3p hsa-miR-29c-5p | 27 | 24 |

*Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RegRNA 2.0.

*MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RegRNA 2.0 software.

**Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RNAup.

**MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RNAup software.

Таблица 2. Пары молекул микроРНК (миРНК), способные образовывать дуплексы с минимальной свободной энергией (MFE) 124–37 ккал/моль в постмитотических нейронах коры головного мозга серой крысы

Table 2. MicroRNA (miRNA) molecule pairs capable of forming duplexes with minimum free energy (MFE) 124–37 kcal/mol in rat postmitotic cortical neurons

| миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd) | MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol | MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol | миРНК (1-я и 2-я) miRNA (1 st and 2 nd) | MFE*, ккал/моль MFE*, kcal/mol | MFE**, ккал/моль MFE**, kcal/mol |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| rno-let-7a-5p rno-let-7b-3p | 33 | 31 | rno-let-7a-5p rno-let-7c-2-3p | 28 | 27 |
| rno-let-7a-5p rno-let-7f-2-3p | 27 | 27 | rno-let-7a-5p rno-let-7d-3p | 33 | 31 |
| rno-let-7b-5p rno-let-7d-3p | 32 | 30 | rno-let-7b-5p rno-let-7a-1-3p | 27 | 26 |
| rno-let-7b-5p rno-let-7c-2-3p | 27 | 26 | rno-let-7b-5p rno-let-7f-2-3p | 27 | 25 |
| rno-let-7b-5p rno-let-7i-3p | 27 | 25 | rno-let-7e-5p rno-let-7d-3p | 30 | 29 |
| rno-let-7e-5p rno-let-7c-1-3p | 28 | 27 | rno-let-7f-5p rno-let-7c-2-3p | 28 | 27 |
| rno-let-7e-5p rno-let-7a-2-3p | 31 | 29 | rno-let-7a-3p rno-let-7c-5p | 26 | 27 |
| rno-let-7a-3p rno-let-7f-5p | 27 | 28 | rno-let-7b-3p rno-let-7c-5p | 31 | 32 |
| rno-let-7b-3p rno-let-7d-5p | 27 | 29 | rno-let-7b-3p rno-let-7e-5p | 27 | 28 |
| rno-let-7d-3p rno-let-7c-5p | 30 | 32 | rno-let-7c-5p rno-let-7f-2-3p | 27 | 26 |
| rno-miR-9-3 rno-miR-3597-5p | 30 | 30 | rno-miR-92a-3p rno-miR-92b-5p | 31 | 27 |
| rno-miR-298-3p rno-miR-185-5p | 27 | 28 | rno-miR-139-5p rno-miR-128-2-5p | 28 | 27 |
| rno-miR-20b-5p rno-miR-106b-3p | 26 | 27 | rno-miR-17-5p rno-miR-106b-3p | 26 | 26 |
| rno-miR-17-2-3p rno-miR-106b-5p | 26 | 25 | rno-miR-151-5p rno-miR-28-3p | 36 | 37 |
| rno-miR-151-5p rno-miR-708-3p | 33 | 33 | rno-miR-28-3p rno-miR-708-5p | 31 | 30 |
| rno-miR-28-5p rno-miR-708-3p | 29 | 33 | rno-miR-345-5p rno-miR-378-3p | 27 | 26 |
| rno-miR-30a-5p rno-miR-30e-3p | 29 | 29 | rno-miR-30e-3p rno-miR-30d-5p | 29 | 30 |
| rno-miR-30d-5p rno-miR-30a-3p | 30 | 29 | rno-miR-30a-3p rno-miR-30e-5p | 28 | 29 |
| rno-miR-30e-5p rno-miR-30d-3p | 26 | 24 | rno-miR-195-5p rno-miR-16-3p | 28 | 26 |

*Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RegRNA 2.0.

*MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RegRNA 2.0 software.

**Данные MFE, полученные с помощью биоинформатического анализа с использованием программы RNAup.

**MFE data obtained by bioinformatics analysis using the RNAup software.

завываясь с комплементарными им последовательностями промоторов разных генов, длинными некодирующими РНК и при-миРНК [13, 17, 18]. Результаты

исследований по введению в клетку антисмысловых коротких олигонуклеотидов к разным миРНК с последующей их визуализацией *in vivo* подтверждают, что

высокоэнергетические дуплексы могут быть более устойчивы к деградации [16].

Выявленные различия между клетками линии 5-8F NPC человека и постмитотическими нейронами коры мозга крысы в особенностях накопления миРНК в ядре могут быть обусловлены несколькими причинами. Так, в зависимости от стадии развития нейронов количество комплементарных последовательностей-мишеней в цитоплазме может изменяться, что сопровождается перераспределением некоторых миРНК между ядром и цитоплазмой [2, 8]. Также показано селективное накопление ряда миРНК в отростках нейронов, что может приводить к уменьшению количества малых РНК, доступных для транспорта в ядро [19]. Более детальные исследования с разделением внутриклеточных миРНК на цитоплазматический, ядерный и ядрышковый пулы могут расширить наше представление о механизмах селективного внутриклеточного отбора миРНК, способных образовывать низко- и высокоэнергетические дуплексы.

Выявленное нами обогащение пула цитоплазматических миРНК молекулами, способными образовывать более энергетически стабильные дуплексы в опухолевых клетках линии 5-8 NPC, может представлять дополнительный механизм регуляции активности миРНК в отношении их таргетных мРНК за счет секвестирования миРНК в цитоплазме в составе дуплексов.

Маркерные мотивы и их влияние на локализацию миРНК. Согласно некоторым данным литературы определенные мотивы в последовательности молекул миРНК могут влиять на их дальнейшую компартиментализацию, определяя внутриклеточную локализацию и секрецию. Например, были найдены последовательности из 4 нуклеотидов GGAG, способствующие селективному отбору миРНК млекопитающих в экзосомы [5]. Имеются данные, согласно которым накопление в ядре различных миРНК может быть ассоциировано с наличием на их 3'-концах определенных мотивов [2, 18]. Такие нуклеотидные мотивы (например, AGUGUU и AGAGUU) обнаружены на 3'-концах миРНК hsa-mir-29b-3p и hsa-mir-373-3p, что, по мнению авторов, привело к преобладанию этих миРНК в клеточных ядрах [2, 18]. В то же время в другой работе анализ данных глубокого секвенирования нескольких сотен миРНК не выявил корреляции наличия мотивов AGUGUU, а также более коротких (AGUG, AGUGU) или длинных (AGUGUUU) вариантов последовательностей в последних 9 нуклеотидах на 3'-конце миРНК, с их преобладанием в ядре, за исключением hsa-mir-29b-3p [7].

Проведенный нами анализ выборок миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы, из 2 типов клеток показал наличие молекул, как обладающих, так и не обладающих мотивами AGUGU, AGUG, ассоциированными с локализацией в ядре [2, 7], и мотивом GGAG, способствующим выведению миРНК в составе экзосом. В то же время доля этих молекул по отношению ко всем миРНК, способным



Рис. 4. Группы микроРНК (миРНК), отличающиеся короткими мотивами, в пуле миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы. Ряд 1 обозначает миРНК из клеток линии 5-8F назофарингеальной карциномы человека, ряд 2 – миРНК из постмитотических нейронов коры мозга крысы. 1 – группа миРНК, не содержащих мотивы ядерной локализации; 2 – группа миРНК, имеющая мотив AGUG; 3 – группа миРНК, имеющая мотив AGUGU; 4 – группа миРНК, имеющая мотив GGAG; 5 – группа миРНК, имеющая мотивы UGUGUU, ACUGUU, AGAGUU, AGUCUU, AGUGAU, AGUGUA, AGUGUU, UCAGUG, GUGUUU, AGUGUUU. В скобках – соотношение N/C

Fig. 4. MicroRNA (miRNA) groups with different short motifs in the miRNA pool capable of forming high-energy duplexes. Row 1 shows miRNA from human nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F, row 2 – miRNA from rat postmitotic cortical neurons. 1 – miRNA group without nuclear localization motifs; 2 – miRNA group with AGUG motif; 3 – miRNA group with AGUGU motif; 4 – miRNA group with GGAG motif; 5 – miRNA group with UGUGUU, ACUGUU, AGAGUU, AGUCUU, AGUGAU, AGUGUA, AGUGUU, UCAGUG, GUGUUU, AGUGUUU motifs. N/C ratio is presented in brackets

образовывать высокоэнергетические дуплексы, составляет не более 8–22 % (рис. 4). Анализ соотношения N/C между группами миРНК в зависимости от наличия мотивов AGUGU, AGUG, GGAG в последних 9 нуклеотидах на 3'-конце не выявил значимых различий. Другие мотивы – UGUGUU, ACUGUU, AGAGUU, AGUCUU, AGUGAU, AGUGUA, AGUGUU, UCAGUG, GUGUUU, AGUGUUU, предположительно ассоциированные с ядерной локализацией [2, 7, 18], – не обнаружены нами в составе миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы (см. рис. 4). Эти результаты согласуются с данными некоторых работ. Так, для стволовых клеток нейроглии и клеток рака толстой кишки линии HCT116 показано распределение ряда различных миРНК между ядром и цитоплазмой, независимое от наличия мотива AGUGUU или других коротких последовательностей [2, 4].

Таким образом, соотношение N/C для миРНК, способных образовывать высокоэнергетические дуплексы, в клетках линии 5-8 NPC человека и постмитотических нейронах коры мозга крысы не зависит от наличия или отсутствия на их 3'-конце различных коротких мотивов. Результаты нашего исследования свидетельствуют о более сложном механизме внутриклеточного

отбора ряда разных миРНК, которое может наряду с другими факторами определяться энергией возникновения дуплексов миРНК.

Заключение

Селективный отбор миРНК, влияющий на их концентрацию в ядре и цитоплазме, может осуществляться различными путями. Одним из механизмов, позволяющих ограничить доступ миРНК к их мРНК-мишеням, служит образование дуплексов из комплементарных друг другу молекул. Проведенный в работе биоинформатический анализ впервые обнаружил взаимосвязь между внутриклеточной компартиментализацией миРНК (распределение между ядром и цитоплазмой)

и вероятностью образования дуплексов (величиной МФЕ). Обогащение пула цитоплазматических миРНК молекулами, формирующими более стабильные дуплексы, — дополнительное подтверждение регуляторной функции этих структур, ограничивающих взаимодействие миРНК с целевыми мРНК. Обнаруженный феномен может являться важным механизмом эпигенетической регуляции экспрессии генов и активно использоваться трансформированными клетками в процессе малигнизации. Дальнейшие исследования процессов, ведущих к селективному отбору миРНК между различными компартаментами, могут иметь практическое значение при разработке целевых препаратов на основе миРНК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Катохин А.В., Кузнецова Т.Н., Омелянчук Н.А. МиРНК — новые регуляторы активности генов у эукариот. Вестник ВОГиС 2006;10(2):241–72. [Katohin A.V., Kuznetsova T.N., Omel'yanchuk N.A. MiRNA — new regulators of gene activity in eukaryotes. *Vesytik VOGiS = Bulletin VOGiS* 2006;10(2):241–72. (In Russ.)].
2. Jeffries C.D., Fried H.M., Perkins D.O. Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. *RNA* 2011;17(4):657–86. DOI: 10.1261/rna.2006511. PMID: 21363885.
3. Liang H., Zhang J., Zen K. et al. Nuclear microRNAs and their unconventional role in regulating non-coding RNAs. *Protein Cell* 2013;4(5):325–30. DOI: 10.1007/s13238-013-3001-5. PMID: 23584808.
4. Park C.W., Zeng Y., Zhang X. et al. Mature microRNAs identified in highly purified nuclei from HCT116 colon cancer cells. *RNA Biol* 2010;7(5):606–14. PMID: 20864815.
5. Villarroya-Beltri C., Gutiérrez-Vázquez C., Sánchez-Cabo F. et al. Sumoylated hnRNP2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* 2013;4(2980):1–10. DOI: 10.1038/ncomms3980. PMID: 24356509.
6. Lai E.C., Wiel C., Rubin G.M. Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA: miRNA duplexes. *RNA* 2004;10(2):171–5. PMID: 14730015.
7. Liao J.-Y., Ma L.-M., Guo Y.-H. et al. Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS One* 2010;5(5):1–14. DOI: 10.1371/journal.pone.0010563. PMID: 20498841.
8. Khudayberdiev S.A., Zampa F., Rajman M., Schrat G. A comprehensive characterization of the nuclear microRNA repertoire of post-mitotic neurons. *Front Mol Neurosci* 2013;6(43):1–19. DOI: 10.3389/fnmol.2013.00043. PMID: 24324399.
9. Huang H.Y., Chien C.H., Jen K.H., Huang H.D. RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucl Aci Res* 2006;34. DOI: 10.1093/nar/gkl333. PMID: 16845041.
10. Gu X., Mooers B.H., Thomas L.M. et al. Structures and energetics of four adjacent G-U pairs that stabilize an RNA helix. *J Phys Chem B* 2015;119(42):13252–61. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b06970. PMID: 26425937.
11. Mathews D.H., Disney M.D., Childs J.L. et al. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(19):7287–92. DOI: 10.1073/pnas.0401799101. PMID: 15123812.
12. Chen P.S., Su J.L., Cha S.T. et al. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;121(9):3442–55. DOI: 10.1172/JCI45390. PMID: 21841313.
13. Wong J.J., Ritchie W., Gao D. et al. Identification of nuclear-enriched miRNAs during mouse granulopoiesis. *J Hematol Oncol* 2014;7(42):1–15. DOI: 10.1186/1756-8722-7-42. PMID: 24886830.
14. Кушлинский Н.Е., Фридман М.В., Брага Э.А. Молекулярные механизмы и микроРНК в патогенезе остеосаркомы. *Биохимия* 2016;81(4):448–64. [Kushlinskiy N.E., Friedman M.V., Braga E.A. Molecular mechanisms and microRNAs in the pathogenesis of osteosarcoma. *Biokhimiya = Biochemistry* 2016;81(4):448–64. (In Russ.)].
15. Shu J., Xia Z., Li L. et al. Dose-dependent differential mRNA target selection and regulation by let-7a-7f and miR-17-92 cluster microRNAs. *RNA Biol* 2012;9(10):1275–87. DOI: 10.4161/rna.21998. PMID: 22995834.
16. Pitchiaya S., Heinicke L.A., Park J.I. et al. Resolving subcellular miRNA trafficking and turnover at single-molecule resolution. *Cell Report* 2017;19:630–42. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.075. PMID: 28423324.
17. Korla K., Arrigo P., Mitra C.K. Promoters, toll like receptors and microRNAs: A strange association. *Indian J Biochem Biophys* 2013;50(3):169–76. PMID: 23898479.
18. Hwang H.W., Wentzel E.A., Mendell J.T. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 2007;315(5808):97–100. DOI: 10.1126/science.1136235. PMID: 17204650.
19. Wang B., Bao L. Axonal microRNAs: localization, function and regulatory mechanism during axon development. *J Mol Cell Biol* 2017;9(2):82–90. DOI: 10.1093/jmcb/mjw050. PMID: 27932485.

Благодарность. Авторы выражают благодарность J.-Y. Liao и соавт., а также Sharof A. Khudayberdiev и соавт. за публикацию в приложениях к их статьям данных секвенирования.

Acknowledgment. Authors express gratitude to J.-Y. Liao with co-authors and Sharof A. Khudayberdiev with co-authors for the publication as supporting information to their articles of sequencing data.

Вклад авторов

С.А. Кузьмичев: биоинформатический анализ, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

А.В. Комельков: статистический анализ результатов исследования;

Е.М. Чевкина: разработка дизайна исследований, редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

S.A. Kuzmichev: bioinformatic analysis, article writing, reviewing of publications of the article's theme;

A.V. Komelkov: statistical analysis;

E.M. Tchekina: developing the research design, article editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.А. Кузьмичев/S.A. Kuzmichev: <https://orcid.org/0000-0003-1660-0898>

А.В. Комельков/A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>

Е.М. Чевкина/E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 26.06.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 26.06.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.