

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

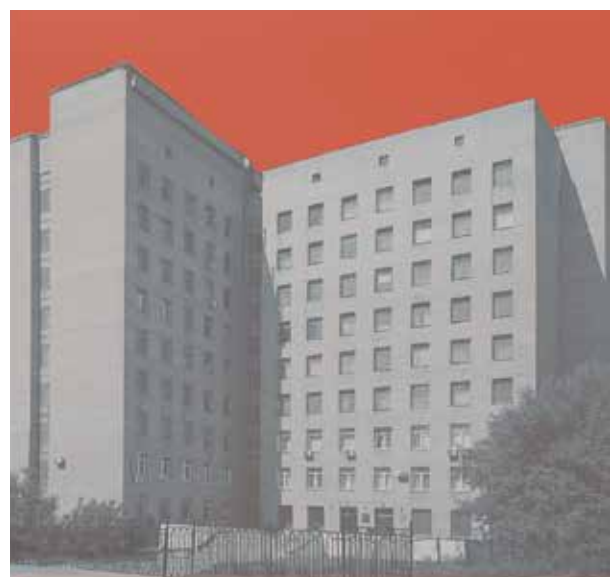


МикроРНК при аденоме гипофиза

*Иммунотерапия на основе
дендритных клеток в лечении
рака мочевого пузыря*

*Экспрессия раково-
тестикулярных генов при
множественной миеломе*

*Ингибирование KRAS-сигнального
каскада при комбинированном
действии рапамицина
и паклитаксела*



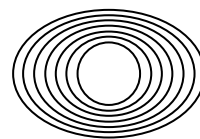
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

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.

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

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)

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

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

Принем статей: онлайн на сайте

<http://umo.abvpress.ru/jour>

или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор Н.В. Жукова

Корректор В.А. Пичугина

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

Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,

kuznetsov@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. № 2. 1–70

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

2 ^{ТОМ 5}
'18

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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)

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)

Глушанкова Наталия Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов 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, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

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 Мангейм университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующая отделением научного планирования и подготовки кадров 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 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель начальника Управления по взаимодействию с РАН, ответственный секретарь Научно-координационного совета Федерального агентства научных организаций России (Москва, Россия)

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

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

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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)

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

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

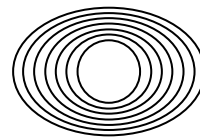
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

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).

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

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)

FOUNDED IN 2014

2 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 N.A. Pichugina
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 R.A. Kuznetsov,
+7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@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. 2. 1—70

© PH "ABV-Press", 2018

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITORIAL BOARD

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)*

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)*

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)*

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, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

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)*

Kubasova Irina Yu., *PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel 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 Laboratory of Clinical Biochemistry of the 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)*

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)*

Lichtenstein Anatoly V., *PhD, DSc, Leading Researcher of the Department of the Experimental Biology Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

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., *MD, DSc, Deputy Head of the Department for Interaction with the RAS, Secretary in Charge of the Scientific Coordination Council of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia, (Moscow, Russia)*

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

EDITORIAL COUNCIL

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)*

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 N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Kopin Boris P., *MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant 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)*

Информация для авторов

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

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным разрешением на публикацию, заверенным печатью учреждения, в котором работает первый в списке автор. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

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

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

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

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

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, 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

И.Ф. Гареев, О.А. Бейлерли

Изучение роли микроРНК при аденоме гипофиза 8

А.С. Ильницкая, А.Б. Данилова, И.А. Балдуева

Иммунотерапия на основе дендритных клеток в лечении рака мочевого пузыря 16

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Т.А. Богуш, С.А. Калюжный, М.Р. Четыркина, М.А. Ястребова,
А.М. Щербаков, И.А. Мамичев, А.А. Каменский*

Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека 24

Е.В. Каюкова, Т.Е. Белокриницкая, П.П. Терешков

Влияние пропionato на спектр высших жирных кислот в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации 31

М.Н. Юрова, Д.Р. Сафина, И.В. Мизгирев

Селективное ингибирование *KRAS*-сигнального каскада при комбинированном воздействии низких доз рапамицина и паклитаксела *in vivo* 42

М.В. Кручинина, В.Н. Кручинин, Я.И. Прудникова, А.А. Громов, М.В. Шашков, А.С. Соколова

Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска 50

*А.А. Солодовник, А.С. Мкртчян, В.А. Мисюрин, В.В. Тихонова, Ю.П. Финашутина,
Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова, О.М. Вотякова, О.Ю. Якимович, О.М. Володина,
М.Ю. Кичигина, Е.Г. Медведовская, А.С. Антипова, И.З. Заводнова, А.А. Семенова,
Г.Р. Аракелян, Ю.Е. Рябухина, О.А. Коломейцев, А.Д. Ширин, Е.А. Османов, А.В. Мисюрин*

Экспрессия раково-тестикулярных генов *PRAME*, *NY-ES01*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой, их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидива 62

REVIEWS

I.F. Gareev, O.A. Beylerli

A study of the role of microRNA in pituitary adenoma 8

A.S. Initskaya, A.B. Danilova, I.A. Baldueva

Immunotherapy based on dendritic cells in bladder cancer treatment 16

EXPERIMENTAL REPORTS

T.A. Bogush, S.A. Kaliuzhny, M.R. Chetyrkina, M.A. Yastrebova,

A.M. Scherbakov, I.A. Mamichev, A.A. Kamensky

Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors 24

E.V. Kayukova, T.E. Belokrinitskaya, P.P. Tereshkov

**The influence of propionate on the spectrum of long-chain fatty acids
in cervical cells during dis- and neoplastic transformation** 31

M.N. Yurova, D.R. Safina, I.V. Mizgirev

Selective inhibition of KRAS signaling by combination of low dose rapamycin and paclitaxel *in vivo* 42

M.V. Kruchinina, V.N. Kruchinin, Ya.I. Prudnikova, A.A. Gromov, M.V. Shashkov, A.S. Sokolova

**Study of the level of fatty acids in erythrocyte membranes and serum of patients
with colorectal cancer in Novosibirsk** 50

A.A. Solodovnik, H.S. Mkrchyan, V.A. Misyurin, V.V. Tikhonova, Yu.P. Finashutina,

N.N. Kasatkina, O.N. Solopova¹, O.M. Votyakova, O. Yu. Yakimovich, O.M. Volodina,

M.Yu. Kichigina, E.G. Medvedovskaya, A.S. Antipova, I.Z. Zavodnova, A.A. Semenova,

G.R. Arakelyan, Yu.E. Ryabukhina, O.A. Kolomeytsev, A.D. Shirin, E.A. Osmanov, A.V. Misyurin

**Expression of cancer-testis genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1,
SLLP1, PASD1 in patients with multiple myeloma, their influence on overall survival and relapse rate** 62

Изучение роли микроРНК при аденоме гипофиза

И. Ф. Гареев, О. А. Бейлерли

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

Контакты: Ильгиз Фанилевич Гареев ilgiz_gareev@mail.ru

МикроРНК представляют собой новый класс малых некодирующих РНК длиной 18–22 нуклеотида, которые играют решающую роль в качестве посттранскрипционных регуляторов экспрессии генов. Из-за большого количества регулируемых генов микроРНК участвуют во многих клеточных процессах. Исследование нарушений экспрессии генов-мишеней микроРНК, часто связанных с изменениями важных биологических характеристик, дает представление о роли микроРНК в онкогенезе. Новые данные свидетельствуют о том, что aberrantная экспрессия микроРНК или дисрегуляция эндогенных микроРНК влияет на возникновение и развитие опухолей, в том числе аденом гипофиза. В настоящем обзоре оценена значимость некоторых микроРНК в патологии аденомы гипофиза, а также представлены данные, касающиеся изучения микроРНК в качестве терапевтических мишеней и новых биомаркеров.

Ключевые слова: микроРНК, гипофиз, аденома гипофиза

Для цитирования: Гареев И. Ф., Бейлерли О. А. Изучение роли микроРНК при аденоме гипофиза. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(2):8–15.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-8-15

A study of the role of microRNA in pituitary adenoma

I. F. Gareev, O. A. Beylerli

Bashkortostan State Medical University, Ministry of Health of Russia, 3 Lenina St., Ufa 450008, Bashkortostan Republic, Russia

MicroRNAs are a new class of small non-coding RNAs, a length of 18–22 nucleotides that play a decisive role as posttranscriptional regulators of gene expression. Due to the large number of genes, regulated microRNAs, microRNAs are involved in many cellular processes. The study of the impairment of the expression of the target genes of microRNA, often associated with changes in important biological characteristics, provides a significant understanding of the role of microRNAs in oncogenesis. New evidence suggests that aberrant microRNA expression or dysregulation of endogenous microRNAs affects the onset and development of tumors, including adenomas of the pituitary gland. In this review, the significance of some microRNAs in the pathology of the pituitary adenoma will be assessed, as well as data on the study of microRNAs as therapeutic targets and new biomarkers.

Key words: microRNA, pituitary, pituitary adenoma

For citation: Gareev I. F., Beylerli O. A. A study of the role of microRNA in pituitary adenoma. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2018;5(2):8–15.

Введение

Опухоли гипофиза обычно доброкачественны, хотя могут иметь место случаи агрессивного роста [1]. Неопластическая трансформация каждого типа клеток гипофиза приводит к развитию определенного подтипа опухоли, который может быть как гормонально активным, так и неактивным. Несколько характерных признаков гипофизарной неоплазии указывают на уникальный характер роста, отличный от такового при других эндокринных и неэндокринных новообразованиях.

Аденома гипофиза – доброкачественное моноклональное новообразование, возникающее при трансформации клеток передней доли гипофиза (аденогипофиз), и, как правило, характеризуется небольшой

зоной поражения, медленным ростом и отсутствием вторичных очагов. Аденомы гипофиза являются 3-й по распространенности опухолью центральной нервной системы после менингиом и глиом, составляя до 15–20 % внутричерепных новообразований, и имеют общую распространенность клинических случаев 80–90 на 100 тыс. человек населения [2].

МикроРНК (miRNAs) – небольшие, размером приблизительно 18–22 нуклеотида, одноцепочечные некодирующие молекулы РНК. Они служат посттранскрипционными регуляторами экспрессии генов путем связывания оснований с целевыми РНК-носителями (матричной РНК (мРНК)). Циркулирующие микроРНК, как свободные, так и в составе экзосом, служат средством межклеточной и межтканевой коммуникации,

а нарушение баланса их экспрессии может оказывать системное действие на весь организм.

Не вызывает сомнений тот факт, что микроРНК играют важную роль во многих биологических процессах, таких как контроль клеточного цикла, пролиферация, апоптоз, дифференцировка, и таким образом регулируют эмбриональное развитие, гемопоэз и т. д. [3]. Быстро растущая совокупность доказательств свидетельствует, что изменения спектра и уровня экспрессии микроРНК ассоциированы с возникновением, ростом и прогрессией опухолей. Некоторые микроРНК могут выступать в роли онкогенов (oncomiRs), в то время как другие микроРНК, как предполагается, являются опухолевыми супрессорами [4]. Однако следует отметить, что такое деление довольно условно, так как в зависимости от клеточного контекста и типа неоплазии одна и та же микроРНК может играть в трансформации и опухолевой прогрессии как провоцирующую, так и супрессирующую роль. Таким образом, единичные микроРНК и их панели могут быть полезны при диагностике и прогнозе онкологических заболеваний [5]. Наш обзор сосредоточен на исследованиях, посвященных вовлечению микроРНК в онкогенез гипофиза, развитию опухоли и использованию микроРНК в качестве биомаркеров и возможной терапии данной патологии.

МикроРНК и физиологические функции гипофиза

МикроРНК экспрессируются в тканях специфически, и их спектр меняется соответственно разным фазам клеточного цикла и стадиям тканевого роста, что обеспечивает дифференцировку клеток и тканей [6]. Недавно продемонстрировано участие микроРНК и в развитии гипофиза. Действительно, miR-26b регулирует экспрессию 2 основных факторов транскрипции – Lef-1 и Pit-1, которые контролируют начало дифференцировки клеток гипофиза [7].

Кроме того, в нескольких исследованиях продемонстрировано активное участие микроРНК в гормональной секреции переднего гипофиза. Экспрессию пропiomеланокортина, индуцируемого кортикотропином, отрицательно регулирует miR-375, тогда как miR-449 контролирует экспрессию генов, отвечающих за функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечной системы в ответ на стресс [8]. Глюкокортикоиды увеличивают экспрессию miR-449, которая, в свою очередь, снижает уровень мРНК кортиколиберина [9]. Другим важным достижением является открытие регуляции экспрессии гонадотропина с помощью микроРНК. Действительно, miR-361-3p отрицательно регулирует секрецию фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тогда как miR-132 и miR-212 модулируют его экспрессию, индуцируемую гонадотропными клетками [10, 11]. Кроме того, нарушение процессинга микроРНК связано с гипофизарной дисфункцией и нейродегенерацией, что подчеркивает важность микроРНК в поддержании физиологических функций гипофиза [12]. Результаты недавнего

исследования Н. Wang и соавт. показали, что Dicer-зависимые микроРНК необходимы для контроля уровня продукции гонадотропина и фертильности у мышей [13]. Как известно, Dicer – член семейства РНКаз III нуклеазы, определяющей процессинг микроРНК. Замечено, что при удалении Dicer подавляются все микроРНК, мишенями которых являются субъединицы белков гонадотропина. Это приводит к изменению контроля уровня гормона, что вызывает репродуктивную дисфункцию и, как следствие, снижение фертильности [13]. Лютеинизирующий гормон (ЛГ), продуцируемый гонадотропными клетками, ингибируется miR-325-3p в культурах первичных клеток крысы [14]. МикроРНК также участвуют в физиологическом развитии гонадотропных клеток. Экспрессию проапоптотического белка прохибитина в зрелых гонадотропах подавляет miR-27 и тем самым активирует апоптоз [15].

Недавно продемонстрировано также, что микроРНК регулируют секрецию гипофизарных гормонов задних отделов. Действительно, miR-24 идентифицирована как один из регуляторов окситоцина [16].

В исследованиях сыворотки крови в группе детей с комбинированным дефицитом гипофизарного гормона (СРНД) и тяжелым эндокринным расстройством показано, что уровень 2 микроРНК (miR-511 и miR-593), мишенью которых является PROP1 (Prop Paired-Like Homeobox 1), увеличен [17]. Мутации PROP1 – наиболее распространенная генетическая причина СРНД. Они индуцируют продукцию гормона роста (СТГ), тиреотропина и пролактина [18].

Поскольку целый ряд микроРНК необходим для нормального развития гипофиза, изменения в последовательности таких микроРНК или их экспрессии могут приводить к нарушениям физиологических функций гипофиза.

Роль микроРНК в онкогенезе аденомы гипофиза

Все большее число онкогенов (*GNAS*, *PI3KCA*, *PTTG*), генов-супрессоров опухолей (*GADD45γ*, *AIP*, *MEN1*, *PRKARIA*, *Reprimo*), структурных белков (Magmas) и эпигенетических модификаций нескольких генов (*FGFR2*, *MEGE-A*, *MEG3*) связывают с развитием и прогрессированием аденомы гипофиза [19]. Кроме того, с онкогенезом гипофиза ассоциированы изменения экспрессии белка циклина, ингибиторов циклинзависимой киназы, белка ретинобластомы (pRb) и протеинкиназы С типа дельта (PRKCD) [20, 21].

Недавно появились сообщения о фундаментальной роли микроРНК в опухолевом генезе гипофиза [19]. Ранее высказанное предположение о том, что микроРНК участвуют в развитии аденомы гипофиза, косвенно подтверждается наблюдением, что в клетках аденомы гипофиза часто обнаруживают делеции тех участков хромосомы 13, в которых локализируются miR-15a и miR-16 [22]. Результаты исследования А. Bottoni и соавт. показали, что уровень этих микроРНК

снижается в тканях аденомы по сравнению с нормальной тканью гипофиза, и что их экспрессия обратно коррелирует с диаметром опухоли [22]. Эти доказательства открыли дверь для дальнейших исследований относительно микроРНК при аденоме гипофиза. Хорошо известно, что каждый гистотип аденомы гипофиза имеет специфические биологические особенности. Вышеприведенные данные указывают на то, что профили микроРНК могут отличать аденому гипофиза от нормального гипофиза и в дальнейшем предсказать развитие того или иного гистотипа аденомы [23].

МикроРНК и ЛГ/ФСГ-секретирующая аденома гипофиза. Знания о роли микроРНК в ЛГ/ФСГ-секретирующих опухолях гипофиза все еще отсутствуют, вероятно, потому что патогенез этих новообразований менее известен по сравнению с другими формами аденомы гипофиза. Сообщалось, что уровни miR-374b, miR-548b-3p, miR-603, miR-570 и miR-663 снижаются в гонадотропных аденомах гипофиза по сравнению с нормальными тканями гипофиза [24]. Среди многих других микроРНК с aberrантной экспрессией, обнаруженных S. Liang и соавт., чаще всего наблюдаются изменения экспрессии miR-10b и miR-122. Авторы показали, что miR-10b и miR-503 являются наиболее дифференциально экспрессируемыми в ЛГ/ФСГ-секретирующих аденомах [25].

МикроРНК и СТГ-секретирующая аденома гипофиза. Известно, что некоторые микроРНК повышено экспрессируются в СТГ-секретирующих аденомах по сравнению с нормальным гипофизом, тогда как экспрессия других значительно снижается [22, 26]. На трансляцию HMGA2 непосредственно воздействуют miR-326, miR-432 и miR-570, на HMGA1 и HMGA2 — miR-34b и miR-548c-3p, а мишенью miR-326 и miR-603 является мРНК фактора транскрипции E2F1 [24]. Снижение экспрессии этих микроРНК приводит к повышению уровня продукции белков HMGA и E2F1, обычно наблюдаемых в СТГ-секретирующих аденомах гипофиза. Сверхэкспрессия микроРНК, влияющих на продукцию HMGA и E2F1, уменьшает пролиферацию соматотропных клеток и отрицательно влияет на клеточный цикл опухолевой клетки [24, 26].

В качестве лекарственной терапии для СТГ-секретирующих аденом гипофиза обычно используются аналоги соматостатина пролонгированного действия. Некоторые пациенты демонстрируют устойчивость к фармакологическому лечению, что может быть связано с уменьшением чувствительности рецептора соматостатина 2-го подтипа (SSTR2). Показано, что сверхэкспрессия miR-185 ингибирует рост клеточной линии опухолевых клеток гипофиза крыс GH3 и активирует поздний апоптоз [27]. Эти результаты, даже при отсутствии прямых экспериментальных доказательств роли этой микроРНК в формировании лекарственной устойчивости, указывают на то, что miR-185 может участвовать в патогенезе данного заболевания.

Ранее было показано, что AIP действует как супрессор опухоли, а также экспрессируется в нормальной соматотропной клетке [28]. Соматотропная аденома демонстрирует высокие уровни miR-34a и miR-103 по сравнению с нормальной тканью гипофиза, и эти микроРНК способны снижать экспрессию белка AIP в модели *in vitro*, что указывает на то, что они потенциально могут быть связаны с опухолевым генезом аденомы гипофиза [29]. Что касается других микроРНК, то T. Palumbo и соавт. обнаружили, что одновременное применение ингибитора miR-26 (anti-miR-26) и аналога miR-128 (miRmimics-128) блокирует туморогенез и инвазивность клеток GH3 в соматотропной линии клеток гипофиза MtT/S [30].

МикроРНК и АКТГ-секретирующая аденома гипофиза. Современные данные свидетельствуют о том, что микроРНК являются важными элементами в патогенезе АКТГ-секретирующей аденомы гипофиза. Замечено, что по сравнению с нормальным гипофизом в таких аденомах несколько микроРНК экспрессируются на низких уровнях (let-7a, miR-141, miR-143, miR-145, miR-15a, miR-150, miR-16, miR-21), тогда как другие (miR-122, miR-26a, miR-493) демонстрируют высокий уровень экспрессии [31–33].

Работ по исследованию биологических процессов и клинического значения изменений экспрессии микроРНК все еще недостаточно. На сегодняшний день обнаружено, что низкий уровень miR-141 в кортикотропных аденомах гипофиза ассоциирован с более высокой скоростью ремиссии у прооперированных пациентов [31]. Показано, что в регулировании кортикотропных клеток при аденоме гипофиза участвуют микроРНК семейства miR-26. Мишенью miR-26a является PRKCD известный регулятор многих физиологических процессов, таких как транскрипция, пролиферация, апоптоз и дифференцировка. Более того, одновременное снижение уровня miR-26b и увеличение уровня miR-128 ингибируют способность АКТГ-секретирующей линии клеток аденомы гипофиза мыши (AtT-20) к инвазии и образованию новых колоний, регулируя путь PTEN-АКТ [30]. Эти результаты показывают, что miR-26 может играть одну из ключевых ролей в контроле роста клеток и развитии клеточного цикла АКТГ-секретирующей аденомы гипофиза.

МикроРНК и пролактинсекретирующая аденома гипофиза. Сообщалось, что экспрессия miR-493 и miR-432 положительно коррелирует с уровнями пролактина в сыворотке, тогда как экспрессия miR-342-3p положительно коррелирует с инвазивностью опухоли [34]. Экспрессия miR-16-1 отрицательно коррелирует с экспрессией аргинил-тРНК-синтазы (RARS) и непосредственно ассоциирована с секрецией тРНК-взаимодействующего фактора p43. Последний не только способен модулировать активность RARS, но представляет собой провоспалительный цитокин с важными противоопухолевыми функциями. Эти результаты показывают, что miR-16-1 контролирует некоторые

молекулярные компоненты, вовлеченные в рост лактотрофной опухоли гипофиза [23].

В тканях аденомы гипофиза на низком уровне по сравнению с нормальным гипофизом экспрессируются miR-300, miR-329, miR-381 и miR-655. Пониженная экспрессия этих микроРНК, мишенью которых является мРНК гена, кодирующего белок PTTG1, влияющий на жизнеспособность и пролиферацию гипофизарных клеток как *in vivo*, так и *in vitro*, снижает подвижность клеток и увеличивает программированную гибель клеток в 2 клеточных линиях аденомы крысы, клетках MMQ и GH [35].

МикроРНК и гормонально-неактивная аденома гипофиза. Н. Butz и соавт. провели крупное исследование, посвященное микроРНК в тканях нефункциональных аденом. Они сравнили уровни экспрессии 670 микроРНК у 10 пациентов с гормонально-неактивной аденомой гипофиза и у 10 здоровых доноров. Было показано, что экспрессия 92 микроРНК повышена, а 70 — снижена. Они идентифицировали miR-124, miR-515-5p и miR-872 только в опухолевых образцах, а miR-198, miR-299-5p, miR-497, miR-548c-3p и miR-622 только в нормальных тканях. Анализ показал, что специфическое подмножество этих микроРНК может быть связано с пониженным уровнем трансформирующего фактора роста бета (TGF β) и изменением экспрессии некоторых молекулярных компонентов сигнального пути TGF (Smad3, Smad6, Smad9, MEG и DLK1) [36].

Белок Wee1, митотический ингибитор, способный блокировать клеточный цикл в фазе G2, в нефункциональных аденомах гипофиза обычно характеризуется низким уровнем продукции по сравнению с нормой. Обнаружено, что 3 микроРНК (miR-128, miR-155 и miR-516a-3p), мишенью которых является мРНК Wee1, в нефункциональных аденомах высокоэкспрессированы. Проводилась и экспериментальная трансфекция экзогенных микроРНК. Индуцированная сверхэкспрессия miR-128, miR-155 и miR-516a-3p снижала уровень Wee1 и жизнеспособность клеток HeLa. Эти результаты позволяют предположить, что данные микроРНК участвуют в опухолевом генезе гипофиза [37].

Роль микроРНК в регуляции процессов роста и инвазии опухолевых клеток

В подгруппе гормонально-неактивных аденом профилирование экспрессии микроРНК успешно дифференцирует микроаденомы и макроаденомы [23]. Среди других дифференциально экспрессируемых микроРНК особое значение имеет повышенная регуляция miR-140 в макроаденомах. А.М. Cheng и соавт. ингибировали экспрессию многих микроРНК, включая miR-140, и именно в этом случае наблюдали снижение роста клеток [38]. Это говорит о том, что избыточная экспрессия miR-140 в нефункциональных аденомах гипофиза может привести к пролиферации клеток и способствовать развитию опухоли [23].

Другие микроРНК, экспрессируемые в аденомах гипофиза, также могут контролировать клеточную пролиферацию. Недавно опубликовано сообщение о снижении уровня miR-107 в спорадической ткани аденомы гипофиза по сравнению с нормой. Авторы исследовали влияние miR-107 на клеточную пролиферацию и образование колоний в клеточных линиях крысы и человека. Результаты привели их к выводу, что в клетках гипофиза miR-107 функционирует как супрессор опухолевого роста, что свидетельствует о ее потенциальной роли в патогенезе аденомы [39].

Следует заметить, что данные относительно взаимосвязи между экспрессией miR-15a и miR-16-1 и размером опухоли достаточно противоречивы. Продемонстрировано, что сниженная экспрессия этих микроРНК в СТГ- и пролактинсекретирующих макроаденомах коррелирует с большим диаметром опухоли, что свидетельствует о том, что они влияют на ее рост [22]. Это совпадает с тем фактом, что гены *miR-15a* и *miR-16-1* расположены в хромосомной области 13q14, часто делецируемой в клетках опухолей гипофиза [40]. Делеция 13q14 связана с агрессивным поведением аденом гипофиза и развитием карцином, что свидетельствует об участии генов данного локуса в прогрессии аденом [41]. В отличие от результатов А. Bottoni и соавт., F.C. Amaral и соавт. показали отсутствие связи низкой экспрессии miR-15a и miR-16-1 с размером опухоли в аденомах АКТГ [31]. В других работах среди микроРНК, дифференциально экспрессирующихся в клетках СТГ-секретирующих макро- и микроаденом, уменьшенная экспрессия miR-15a также обнаруживалась, но не коррелировала с размером опухоли [31]. Расхождение может быть связано с недостаточным размером выборки для статистического анализа. В совокупности эти данные касаются только уменьшения экспрессии miR-15a и miR-16-1 при аденоме гипофиза.

Исследования функций микроРНК дают некоторые представления о прогрессии гипофизарных опухолей, хотя инвазия и метастазы при новообразованиях гипофиза редки. Что касается исследований при других онкопатологиях, следует отметить, что значительная корреляция сверхпродукции белка HMGA2 с инвазией опухолевых клеток обнаружена при раке молочной железы и раке желудка [42]. При инвазивном росте опухоли устойчивое окрашивание HMGA2 и снижение экспрессии E-кадгерина наблюдались в образцах плоскоклеточных карцином ротовой полости [43]. Результаты предыдущих исследований показали, что опухолеспецифическое подавление E-кадгерина и N-кадгерина связано также и с инвазивностью аденомы гипофиза [44]. HMGA2 может быть вовлечен в инвазию опухолевых клеток из-за его участия в эпителиально-мезенхимальном переходе. Поскольку микроРНК группы let-7 регулирует экспрессию HMGA2 в аденомах гипофиза, let-7 также может играть роль в инвазии аденомы гипофиза. В исследовании F.C. Amaral и соавт., продемонстрировавшем отсутствие связи экспрессии

микроРНК с размером опухоли у пациентов с АКТГ-секретирующими гипофизарными опухолями со сниженной экспрессией miR-141, высказано предположение о том, что miR-141 может регулировать экспрессию генов гипофиза, вовлеченных в локальную инвазию [31]. Секурин (PTTG1) является мишенью как miR-126, так и miR-381, которые подавлены в СТГ-секретирующих аденомах гипофиза [45]. PTTG1 сверхэкспрессируется в большинстве аденом гипофиза и участвует в инвазии опухолей [46]. Таким образом, miR-126 и miR-381 могут регулировать инвазию аденомы гипофиза, подавляя экспрессию PTTG1.

T. Palumbo и соавт. идентифицировали высокие уровни miR-26b и низкие уровни miR-128 в СТГ-секретирующих опухолях гипофиза [30]. Интересно, что ингибирование miR-26b и сверхэкспрессия miR-128 оказали синергетический эффект на подавление туморогенности и инвазивности опухолей гипофиза. Поскольку дерегулирование PTEN и BMI1 коррелирует с инвазивным и метастатическим фенотипом нескольких типов опухолей человека, возможно, что miR-26b и miR-128 регулируют инвазивность опухолевых клеток гипофиза напрямую через PTEN и BMI1 соответственно [47]. Поскольку метастатические карциномы гипофиза встречаются редко, эти данные свидетельствуют о том, что измененная экспрессия микроРНК может предоставлять диагностическую информацию для стратификации аденомы и карциномы гипофиза до начала метастазирования.

МикроРНК в качестве биомаркеров аденомы гипофиза

Гипофиз, как известно, хорошо васкуляризован, и опухоли гипофиза имеют характерные микрососудистые сети, о чем свидетельствует компьютерный анализ на основе фракталов [1]. Хорошая васкуляризация гипофиза и опухоли указывает на большую вероятность обнаружения молекул в системном кровотоке пациентов. Секретируемые в кровотоке гормоны гипофиза используются в качестве биомаркеров для диагностики или наблюдения. Аберрантные микроРНК также были предложены в качестве потенциальных биомаркеров рецидива опухоли гипофиза [22, 23, 48]. Идентификация таких биомаркеров будет иметь значение в первую очередь в случае гормонально неактивных аденом, которые в основном состоят из гонадотропных клеток, поскольку повышенный уровень циркулирующего гонадотропного гормона обычно не вызывает клинических симптомов у пациентов и не используется в качестве биологического маркера опухоли.

Существует мнение о том, что микроРНК могут выступать в качестве идеальных биомаркеров для раннего выявления, прогнозирования и диагностики опухолей. Биомаркеры опухолевого роста должны быть специфическими; уровень аберрантной экспрессии, обнаруженной в сыворотке, плазме, моче или других биологических жидкостях, должен соответствовать

степени развития опухоли [49]. МикроРНК активно высвобождаются опухолевыми клетками и могут служить в качестве неинвазивных маркеров для диагностики опухолей. Циркулирующие микроРНК могут быть связаны с тканевой экспрессией микроРНК, что подтверждает гипотезу о том, что спектр циркулирующих микроРНК, ассоциированных с возникновением неоплазий, может отражать состояние специфических опухолей. В настоящее время не проводятся исследования по профилированию циркулирующих микроРНК как биомаркеров для аденомы гипофиза. Тем не менее Q. Wang и соавт. исследовали уровни 3 микроРНК (miR-21, miR-128 и miR-342-3p), используемых в качестве контроля при идентификации биомаркеров для глиом, в плазме 10 пациентов с аденомами гипофиза. Авторы пришли к выводу, что эти микроРНК могут продуцироваться только клетками глиомы и, таким образом, специфичны для данной опухоли [50]. В недавнем исследовании B. N. Kelly и соавт. обнаружили, что 4 микроРНК дифференциально экспрессированы у индивидуумов, получающих терапевтические замещающие дозы рекомбинантного человеческого гормона роста по сравнению с лицами с естественным высоким уровнем гормона роста и нормальным контролем [51].

Применение микроРНК в терапевтических целях

Шанс, что микроРНК могут представлять собой инновационное терапевтическое средство — одна из главных захватывающих идей предыдущего десятилетия. Гипотеза, которая по-прежнему существует сегодня, имеет ряд проблем для практического осуществления. Тем не менее разработаны технологии для управления функциями микроРНК *in vivo*. Существуют 3 подхода в подавлении функции микроРНК: генерация генетических модификаций у животных, применение губок микроРНК (miRNA sponges) и олигонуклеотидов, представляющих собой последовательности anti-miR. Существуют также подходы к увеличению экспрессии отдельных микроРНК: генерация трансгенных животных с системными или органоспецифическими особенностями, трансфекция экзогенных аналогов микроРНК (miRNAmimics) и регуляция микроРНК на векторной основе [52, 53]. На сегодняшний день эффективность терапии на основе микроРНК продемонстрирована в отношении новообразований у животных моделей. Высказывалось предположение о том, что «супрессия» онкогенной miR-21 может представлять собой терапевтическую стратегию и при новообразованиях гипофиза [48].

Способность микроРНК регулировать множество генов делает их подходящими для инновационной терапевтической стратегии. Однако в то время как эта способность, с одной стороны, дает определенные преимущества для контроля некоторых сигнальных путей, с другой — она может увеличить количество нежелательных побочных эффектов, что затрудняет терапевтическое использование микроРНК [54].

Заключение

МикроРНК являются ключевыми регуляторами экспрессии генов и выполняют важные физиологические функции во многих тканях, включая гипофиз. Сегодня известно, что микроРНК участвуют также в генезе аденомы гипофиза. Научное сообщество достигло большого успеха, идентифицируя ряд микроРНК с измененной экспрессией в опухолях гипофиза. Поскольку опухоли передней доли гипофиза проявляют различное поведение в зависимости от гистотипа, было бы целесообразно классифицировать микроРНК, относящиеся к определенному классу опухолей. Действительно, их экспрессия специфична в отношении различных гистотипов и мо-

жет коррелировать с размером опухоли и другими клиничко-патологическими особенностями. Несмотря на наличие достоверных доказательств того, что микроРНК задействованы в гипофизарном неопластическом процессе, конкретные механизмы их участия малоизвестны. Современные молекулярно-биологические исследования направлены на определение мишеней отдельных микроРНК и их кластеров, что, безусловно, позволит в дальнейшем добиться тонкой регуляции сигнальных путей, нарушения которых ассоциированы с той или иной патологией. Эти достижения дадут нам возможность манипулировать функциями микроРНК для использования в терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Di Ieva A., Rotondo F., Syro L.V. et al. Aggressive pituitary adenomas – diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10(7):423–35. DOI: 10.1038/nrendo.2014.64. PMID: 24821329.
- Aflorei E.D., Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 2014;117(3):379–94. DOI: 10.1007/s11060-013-1354-5. PMID: 24481996.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350–5. DOI: 10.1038/nature02871. PMID: 15372042.
- Gartel A.L., Kandel E.S. MiRNAs: little known mediators of oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2008;18(2):103–10. DOI: 10.1016/j.semcancer.2008.01.008. PMID: 18295504.
- Zhang J.X., Song W., Chen Z.H. et al. Prognostic and predictive value of a microRNA signature in stage II colon cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2013;14(13):1295–306. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70491-1. PMID: 24239208.
- Wienholds E., Kloosterman W.P., Miska E. et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005;309(5732):310–1. DOI: 10.1126/science.1114519. PMID: 15919954.
- Zhang Z., Florez S., Gutierrez-Hartmann A. et al. MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem* 2010;285(45):34718–28. DOI: 10.1074/jbc.M110.126441. PMID: 20807761.
- Zhang N., Lin J.K., Chen J. et al. MicroRNA 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF) regulating pro-opiomelanocortin (POMC) expression by targeting mitogen-activated protein kinase 8. *J Biol Chem* 2013;288(15):10361–73. DOI: 10.1074/jbc.M112.425504. PMID: 23430746.
- Nemoto T., Mano A., Shibasaki T. MiR-449a contributes to glucocorticoid-induced CRF-R1 downregulation in the pituitary during stress. *Mol Endocrinol* 2013;27(10):1593–602. DOI: 10.1210/me.2012-1357. PMID: 23893957.
- Ye R.S., Xi Q.Y., Qi Q. et al. Differentially expressed miRNAs after GnRH treatment and their potential roles in FSH regulation in porcine anterior pituitary cell. *PLoS One* 2013;8(2):57–156. DOI: 10.1371/journal.pone.0057156. PMID: 23451171.
- Godoy J., Nishimura M., Webster N.J. Gonadotropin-releasing hormone induces miR-132 and miR-212 to regulate cellular morphology and migration in immortalized LbetaT2 pituitary gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2011;25(5):810–20. DOI: 10.1210/me.2010-0352. PMID: 21372146.
- Schneeberger M., Altirriba J., García A. et al. Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol Metab* 2012;2(2):74–85. DOI: 10.1016/j.molmet.2012.10.001. PMID: 24199146.
- Wang H., Graham I., Hastings R. et al. Gonadotrope-specific deletion of Dicer results in severely suppressed gonadotropins and fertility defects. *J Biol Chem* 2015;290(5):2699–714. DOI: 10.1074/jbc.M114.621565. PMID: 25525274.
- Hsueh S.Y., Hsueh A.J. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 2001;7(5):605–11. DOI: 10.1038/87936. PMID: 11329063.
- Savulescu D., Feng J., Ping Y.S. et al. Gonadotropin-releasing hormone-regulated prohibitin mediates apoptosis of the gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 2013;27(11):1856–70. DOI: 10.1210/me.2013-1210. PMID: 24085822.
- Choi J.W., Kang S.M., Lee Y. et al. MicroRNA profiling in the mouse hypothalamus reveals oxytocin-regulating microRNA. *J Neurochem* 2013;126(3):331–37. DOI: 10.1111/jnc.12308. PMID: 23682839.
- Hu Y., Wang Q., Wang Z. et al. Circulating microRNA profiles and the identification of miR-593 and miR-511 which directly target the PROP1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Int J Mol Med* 2015;35(2):358–66. DOI: 10.3892/ijmm.2014.2016. PMID: 25434367.
- Deladoey J., Fluck C., Buyukgebiz A. et al. “Hot spot” in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1645–50. DOI: 10.1210/jcem.84.5.5681. PMID: 10323394.
- Jiang X., Zhang X. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2013;28(4):245–54. DOI: 10.3803/EnM.2013.28.4.245. PMID: 24396688.
- Quereda V., Malumbres M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol* 2009;42(2):75–86. DOI: 10.1677/JME-08-0146. PMID: 18987159.
- Gentilin E., Di Pasquale C., Gagliano T. et al. Protein Kinase C Delta restrains growth in ACTH-secreting pituitary adenoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 2016;419:252–8. DOI: 10.1016/j.beem.2016.10.002. PMID: 26522132.
- Bottoni A., Piccin D., Tagliati F. et al. MiR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*

- 2005;204(1):280–5. DOI: 10.1002/jcp.20282. PMID: 15648093.
23. Bottoni A., Zatelli M.C., Ferracin M. et al. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 2007;210(2): 370–7. DOI: 10.1002/jcp.20832. PMID: 17111382.
 24. D'Angelo D., Palmieri D., Mussnich P. et al. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGAI, HMG2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(7):1128–38. DOI: 10.1210/jc.2011–3482. PMID: 22564666.
 25. Liang S., Chen L., Huang H., Zhi D. The experimental study of miRNA in pituitary adenomas. *Turk Neurosurg* 2013;23(6): 721–7. DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.7425–12.1. PMID: 24310454.
 26. Leone V., Langella C., D'Angelo D. et al. Mir-23b and miR-130b expression is downregulated in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol* 2014;390(1–2):1–7. DOI: 10.1016/j.mce.2014.03.002. PMID: 24681352.
 27. Fan X., Mao Z., He D. et al. Expression of somatostatin receptor subtype 2 in growth hormonesecreting pituitary adenoma and the regulation of miR-185. *J Endocrinol Invest* 2015;38(10):1117–28. DOI: 10.1007/s40618-015-0306-7. PMID: 26036598.
 28. Leontiou C.A., Gueorguiev M., van der Spuy J. et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(6):2390–401. DOI: 10.1210/jc.2007–2611. PMID: 18381572.
 29. Dénes J., Kasuki L., Trivellin G. et al. Regulation of arylhydrocarbon receptor interacting protein (AIP) protein expression by MiR-34a in sporadic somatotropinomas. *PLoS One* 2015;10:107–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0117107.
 30. Palumbo T., Faucz F.R., Azevedo M. et al. Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatomammotrophic tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway. *Oncogene* 2013;32(13):1651–9. DOI: 10.1038/onc.2012.190. PMID: 22614013.
 31. Amaral F.C., Torres N., Saggioro F. et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(1): 320–3. DOI: 10.1210/jc.2008-1451. PMID: 18840638.
 32. Stilling G., Sun Z., Zhang S. et al. MicroRNA expression in ACTH producing pituitary tumors: up-regulation of microRNA-122 and -493 in pituitary carcinomas. *Endocrine* 2010;38(1):67–75. DOI: 10.1007/s12020-010-9346-0. PMID: 20960104.
 33. Gentilin E., Tagliati F., Filieri C. et al. MiR-26a plays an important role in cell cycle regulation in ACTH-secreting pituitary adenomas by modulating protein kinase Cδ. *Endocrinology* 2013;154(5): 1690–700. DOI: 10.1210/en.2012-2070. PMID: 23525216.
 34. Chen Y.X., Li Q., Wang C.D. et al. Differential expression analysis of prolactinoma-related microRNAs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2012;92(5):320–3. PMID: 22490835.
 35. Liang H.Q., Wang R.J., Diao C.F. et al. The PTTG1-targeting miRNAs miR-329, miR-300, miR-381, and miR-655 inhibit pituitary tumor cell tumorigenesis and are involved in a p53/PTTG1 regulation feedback loop. *Oncotarget* 2015;6(30):29413–27. DOI: 10.18632/oncotarget.5003. PMID: 26320179.
 36. Butz H., Likó I., Czirják S. et al. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFβ pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 2011;14(2):112–24. DOI: 10.1007/s11102-010-0268-x. PMID: 21063788.
 37. Butz H., Likó I., Czirják S. et al. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(10):181–91. DOI: 10.1210/jc.2010–0581. PMID: 20668041.
 38. Cheng A.M., Byrom M.W., Shelton J., Ford L.P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005;33(4):1290–7. DOI: 10.1093/nar/gki200. PMID: 15741182.
 39. Trivellin G., Igreja S., Garcia E. et al. MiR-107 inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) and is potentially involved in pituitary tumorigenesis. *Endocr Abstr* 2011;25. DOI: 10.1152/ajpendo.00546.2011.
 40. Fan X., Paetau A., Aalto Y. et al. Gain of chromosome 3 and loss of 13q are frequent alterations in pituitary adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;128(2):97–103. DOI: 10.1016/S0165-4608(01)00398-3. PMID: 11463446.
 41. Zatelli M.C., degli Uberti EC. MicroRNAs and possible role in pituitary adenomas. *Semin Reprod Med* 2008;26(6):453–60. DOI: 10.1055/s-0028-1096125. PMID: 18951327.
 42. Motoyama K., Inoue H., Nakamura Y. et al. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res* 2008;14(8):2334–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07–4667. PMID: 18413822.
 43. Miyazawa J., Mitoro A., Kawashiri S. et al. Expression of mesenchyme-specific gene *HMG42* in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res* 2004;64(6): 2024–9. DOI: 10.1158/0008-5472. PMID: 15026339.
 44. Qian Z.R., Sano T., Yoshimoto K. et al. Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2007;20(12):1269–77. DOI: 10.1038/modpathol.3800965. PMID: 17873891.
 45. Mao Z.G., He D.S., Zhou J. et al. Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 2010;5:79. DOI: 10.1186/1746-1596-5-79. PMID: 21138567.
 46. Salehi F., Kovacs K., Scheithauer B.W. et al. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(3):721–43. DOI: 10.1677/ERC-08-0012. PMID: 18753362.
 47. Guo B.H., Feng Y., Zhang R. et al. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Mol Cancer* 2011;10(1):10. DOI: 10.1186/1476-4598-10-10. PMID: 21276221.
 48. Shi X., Tao B., He H. et al. MicroRNAs-based network: a novel therapeutic agent in pituitary adenoma. *Med Hypotheses* 2012;78(3):380–4. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.12.001. PMID: 22222153.
 49. Zen K., Zhang C.Y. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 2012;32(2):326–48. DOI: 10.1002/med.20215. PMID: 22383180.
 50. Wang Q., Li P., Li A. et al. Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31:97. DOI: 10.1186/1756-9966-31-97. PMID: 23174013.
 51. Kelly B.N., Haverstick D.M., Lee J.K. et al. Circulating microRNA as a biomarker of human growth hormone administration to patients. *Drug Test Anal* 2014;6(3):234–8. DOI: 10.1002/dta.1469. PMID: 23495241.
 52. Jordan S.D., Kruger M., Willmes D.M. et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol* 2011;13(4):434–46. DOI: 10.1038/ncb2211. PMID: 21441927.
 53. Henry J.C., Azevedo-Pouly A.C., Schmittgen T.D. MicroRNA replacement therapy for cancer. *Pharm Res* 2011;28(12): 3030–42. DOI: 10.1007/s11095-011-054. PMID: 21879389.
 54. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Эпигенетика канцерогенеза. Креативная хирургия и онкология 2017;7(3):60–7. DOI: 10.24060/2076-3093-2017-7-3-60-67. [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Epigenetics of carcinogenesis. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya = Creative Surgery and Oncology* 2017;7(3):60–7. (In Russ.)].

Благодарность. Авторы выражают благодарность рецензентам и сотрудникам научной редакции журнала «Успехи молекулярной онкологии» за проделанную ими работу по устранению недочетов данной статьи и предоставленную возможность ее публикации.

Acknowledgements. The authors sincerely thank the reviewers and editorial staff of the Advances of Molecular Oncology journal for their work on improving the shortcomings of this work and the opportunity to publish it.

Вклад авторов

И.Ф. Гареев: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, редактирование текста рукописи;

О.А. Бейлерли: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

I. F. Gareev: reviewing of publications of the article's theme, developing the research design, article writing, article editing;

O. A. Beylerli: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов

И.Ф. Гареев: <https://orcid.org/0000-0002-4965-0835>

О.А. Бейлерли: <https://orcid.org/0000-0002-6149-5460>

ORCID of authors

I. F. Gareev: <https://orcid.org/0000-0002-4965-0835>

O. A. Beylerli: <https://orcid.org/0000-0002-6149-5460>

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: 02.04.2018. **Принята к публикации:** 15.05.2018

Article received: 02.04.2018. **Accepted for publication:** 15.05.2018

Иммунотерапия на основе дендритных клеток в лечении рака мочевого пузыря

А.С. Ильницкая¹, А.Б. Данилова², И.А. Балдуева²

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;
Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Контакты: Алла Станиславовна Ильницкая alla.ilnitskaya@inbox.ru

Разработка противоопухолевой вакцины для терапии рака мочевого пузыря на основе аутологических дендритных клеток (ДК) на сегодняшний день весьма актуальна в связи с доказанной высокой иммуногенностью этого вида опухолей. Вакцинация препаратами на основе ДК демонстрирует эффективность в борьбе с онкологическими заболеваниями в качестве монотерапии и в сочетании с другими методами лечения. Применение таких вакцин считается безопасным, так как связанные с ним побочные эффекты незначительны и могут быть охарактеризованы как нежелательные явления I или II степени. При создании ДК-вакцин возникает ряд аспектов, который необходимо тщательно проработать. Среди них следует особенно выделить проблему подбора потенциальных мишеней для воздействия вакцинотерапии, способов усиления иммуногенности вакцины, выбора технологии получения достаточного количества функциональных ДК. В обзоре уделено внимание вопросам использования аутологичного и аллогенного антигенного материала для активации ДК, результатам экспериментальных и клинических исследований ДК-вакцин при раке мочевого пузыря.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, иммунотерапия, дендритно-клеточная вакцина, клинические исследования

Для цитирования: Ильницкая А.С., Данилова А.Б., Балдуева И.А. Иммунотерапия на основе дендритных клеток в лечении рака мочевого пузыря. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(2):16–23.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-16-23

Immunotherapy based on dendritic cells in bladder cancer treatment

A.S. Ilnitskaya¹, A.B. Danilova², I.A. Baldueva²

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

²N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
68 Leningradskaya St., Pesochniy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia

The development of an antitumor vaccine based on autologous dendritic cells (DCs) for bladder cancer treatment is extremely relevant today due to the proven high immunological potency of this type of tumor. Vaccination with DCs-based drugs as a monotherapy or in combination with other methods of treatment has shown to be effective in cancer therapy. The vaccine administration is considered to be safe, the associated side effects are insignificant and can be characterized as undesirable phenomena of 1st or 2nd degree. There are a number of issues that arise while creating DCs vaccines that need to be carefully resolved. Among them, the problem of selecting potential targets for the vaccine treatment, the ways to enhance the potency of the vaccine, and the selection of technology for obtaining a sufficient number of functional DCs should be specifically mentioned. The review focuses on the use of autoantigen or alloantibody material for the activation of DCs, and the results of experimental and clinical studies of DCs vaccines in bladder cancer.

Key words: bladder cancer, immunotherapy, dendritic-cell vaccine, clinical trials

For citation: Ilnitskaya A.S., Danilova A.B., Baldueva I.A. Immunotherapy based on dendritic cells in bladder cancer treatment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(2):16–23.

Введение

Согласно мировой статистике рак мочевого пузыря (РМП) занимает 4-е место среди наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у мужчин и 11-е место у женщин. Ежегодно по всему миру диагностируют около 400 тыс. новых случаев

этого заболевания [1]. По данным R.L. Siegel и соавт., в США на 79 030 новых эпизодов РМП приходится 16 870 случаев летального исхода. В структуре онкологических заболеваний в России опухоли мочевого пузыря составляют 2,8 % [2]. Приблизительно в 75 % случаев РМП выявляют поверхностный, неинвазивный

гистологический тип опухоли, однако у половины пациентов с неинвазивным РМП, которым была проведена трансуретральная резекция, впоследствии регистрируют рецидив заболевания, и у 5–25 % этих больных наблюдается прогрессирование до мышечно-инвазивной стадии после повторных рецидивов [3].

Уротелиальную карциному можно отнести к одной из наиболее агрессивных форм злокачественных новообразований. Безусловно, хирургические методы, химио- и лучевая терапия являются стандартом лечения данного вида злокачественных опухолей, однако их высокая способность к метастазированию и формирование лекарственной устойчивости создают предпосылки для поиска и создания новых терапевтических подходов. Схемы химиотерапии, применяющиеся при лечении РМП, нередко сопровождаются серьезными нежелательными явлениями, а использование лучевой терапии для оптимизации борьбы с опухолью малого таза не всегда оправдано и часто не дает желаемого эффекта [4, 5]. Кроме того, вынужденное применение радикальных операций, таких как цистэктомия с различными методами деривации мочи, тяжело переносится пациентами в силу сопутствующей соматической патологии, тяжести операционной травмы, объема кровопотери и возраста больного [6]. На сегодняшний день накопленные данные экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что иммунотерапия (ИТ) может служить мощным оружием для элиминации метастатического процесса, так как ее действие напрямую нацелено на опухолевые клетки. Индукция противоопухолевого иммунного ответа потенциально направлена на уничтожение опухоли в различных труднодоступных органах тела, что не всегда может быть достигнуто другими методами [7].

Виды иммунотерапии рака мочевого пузыря

ИТ имеет относительно успешную историю в лечении рака мочеполовых путей: начиная с применения внутрипузырной ИТ противотуберкулезной вакциной Кальметта–Герена (БЦЖ) [2, 8–10], которая в настоящее время используется в качестве основной терапии для лечения поверхностного РМП после трансуретральной резекции. Тем не менее этот метод имеет ограниченную эффективность и высокий уровень токсичности и побочных эффектов [11]. Иммуногенность РМП не вызывает сомнений, так как характерная его особенность – высокий уровень мутационной нагрузки [12].

В настоящее время весьма актуальными являются исследования блокаторов «иммунных точек» – моноклональных антител против PDL-1, PD-1 и CTLA-4 при лечении РМП [13]. По последним данным С. Grüllich, эффективность применения ингибиторов PD-1 при РМП составляет приблизительно 25 %, кроме того, отмечено увеличение общей выживаемости пациентов до 4 мес по сравнению с больными, в отношении которых использовались стандартные методы лечения [14]. Ввиду восприимчивости опухоли к ИТ в литературе

появляются сообщения об исследованиях, посвященных применению адаптивной ИТ с использованием аутологических Т-лимфоцитов, а также разработке противоопухолевых вакцин РМП, в том числе на основе дендритных клеток (ДК) [15–17].

По современным представлениям ДК являются наиболее эффективными индукторами противоопухолевого иммунитета [18] и уже более 20 лет находятся в центре внимания широкого круга исследований, основная цель которых – создание клеточных вакцин, способных модифицировать иммунный ответ у больных со злокачественными новообразованиями [19]. ДК – так называемые профессиональные антигенпрезентирующие клетки – играют фундаментальную роль в противоопухолевом иммунитете, так как обладают уникальной способностью захватывать, перерабатывать и представлять опухолевые антигены Т-лимфоцитам. Они могут стимулировать дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в активированные, специфичные к опухоли эффекторные лимфоциты [20], а также усиливают противоопухолевую активность натуральных киллеров (NK-клеток) путем увеличения их цитолитических способностей и продукции ими интерферона гамма (IFN- γ) [21]. Помимо роли «дирижеров» врожденных и адаптивных иммунных реакций, ДК могут функционировать в качестве прямых цитотоксических эффекторов против опухолей [22, 23]. Использование вакцин, созданных на основе ДК, демонстрирует эффективность в лечении различных онкологических заболеваний и считается безопасным, так как побочные действия, связанные с их применением, относительно мягкие, кратковременные, обычно включают лихорадку, реакцию в месте инъекции, аденопатию, общее недомогание и могут быть классифицированы как нежелательные явления I и II степеней тяжести [19, 24].

Мишени для воздействия дендритно-клеточной вакцинотерапии при раке мочевого пузыря.

Использование аутологичного и аллогенного антигенного материала для производства дендритно-клеточных вакцин против рака мочевого пузыря

Успешное применение ДК-вакцин для лечения РМП зависит от использования в качестве мишеней соответствующих целевых антигенов и эффективных стратегий иммунизации. Известные на сегодняшний день потенциальные мишени для разработки методов вакцинотерапии уротелиальной карциномы включают рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), опухолеассоциированные антигены (ОАА), среди которых особое значение имеют раковотестикулярные антигены (РТА), такие как NY-ESO-1, LAGE-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, CT7, CT10 и GAGE [15, 25], а также один из представителей семейства ингибиторов апоптоза сурвивин [7].

Молекулы, участвующие в регуляции апоптоза, могут быть потенциальными мишенями для терапии опухолей, в том числе ИТ. Известно, что сурвивин

(BIRC5), самый маленький, структурно уникальный член семейства ингибиторов апоптоза, часто гиперэкспрессирован в опухолях по сравнению с уровнем его экспрессии в нормальных дифференцированных тканях человека. Сурвивин участвует в процессах контроля деления клеток и ингибирования апоптоза, индуцирует ангиогенез и, таким образом, может играть ключевую роль в развитии опухолей [7]. Показана высокая степень экспрессии сурвивина в клетках уротелиальной карциномы [26].

Очень важным является выбор антигенного материала как точки приложения для активации специфического противоопухолевого иммунного ответа в контексте создания ДК-вакцины для лечения РМП [15, 27]. Прежде всего, потому что помимо известных ОАА могут быть презентованы и индивидуальные опухолевые антигены, характерные исключительно для конкретного пациента [28]. Предпочтительно использование цельных опухолевых клеток в качестве источника антигенов по сравнению с отдельно взятыми антигенами, так как можно ожидать формирование иммунного ответа, нацеленного одновременно на множественные опухолевые антигены, благодаря чему возможно обеспечить эффективное направленное действие на большинство малигнизированных клеток в растущей опухоли [29]. Создание таких вакцин сопряжено с необходимостью их стандартизации. В частности, нужно оптимизировать методику получения первичной культуры опухолевых клеток из индивидуального операционного материала.

Несмотря на преимущества использования аутологичного опухолевого материала в качестве антигенов при производстве ДК-вакцин, этот подход технически весьма ограничен, поскольку является трудоемким (в частности, из-за длительного культивирования первичных опухолевых клеток и возможности потенциальной микробиологической контаминации), дорогостоящим и непригодным для пациентов с низким статусом опухолевой нагрузки. Для того, чтобы преодолеть эти ограничения, в качестве альтернативного источника ОАА могут быть использованы аллогенные опухолевые клетки или опухолевые клеточные линии, полученные из опухолей различных локализаций [30]. Научная основа этого подхода состоит в том, что аллогенные линии опухолевых клеток могут экспрессировать те же основные ОАА, что и клетки аутологичной опухоли. Хорошо охарактеризованные аллогенные линии опухолевых клеток, имеющие высокую пролиферативную активность *in vitro*, способны экспрессировать достаточное количество ОАА для нагрузки и активации ДК, кроме того, их возможно стандартизировать и использовать в крупномасштабном производстве вакцин [31].

Способы усиления иммуногенности дендритно-клеточных вакцин

Несостоятельность иммунного ответа при злокачественных новообразованиях, которая может быть

связана со способностью опухолевых клеток «ускользнуть» от воздействия клеток иммунной системы, в том числе за счет продукции разнообразных факторов, ингибирующих их нормальное функционирование, также находится в центре внимания. У пациентов с РМП выявлены «несостоятельные» ДК, которые демонстрируют низкую и/или дефектную экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) и некоторых ко-стимулирующих молекул [32]. При создании вакцин на основе ДК очень важно получить достаточное количество функциональных клеток для инициации полноценного специфического иммунного ответа. Необходимо найти способы усиления этого иммунного ответа, генерируемого ДК. Известно, что ДК могут быть модифицированы для повышения их способности индуцировать иммунный ответ, и это может быть достигнуто за счет использования определенных белков-носителей, адъювантов, цитокинов или генетически модифицированных вирусов [33, 34].

С этих позиций может представлять интерес дыхательный пигмент гемоцианин брюхоного моллюска *Fissurella latimarginata* (KLH), который обладает значимым иммуностимулирующим действием и может применяться в качестве адъюванта в иммуногенных композициях. KLH добавляют в ДК-вакцины для неспецифической стимуляции Т-хелперов и мониторинга вакцинированных иммунных реакций [35, 36]. Накапливаются доказательства того, что использование неспецифических вспомогательных агентов, таких как KLH, имеет решающее значение для индукции эффективного противоопухолевого ответа [37, 38]. KLH применяется в качестве самостоятельного местного средства для лечения РМП [34]. Не исключено, что использование данного пептида-иммуноносителя при производстве вакцин на основе ДК против уротелиальной карциномы в ближайшем будущем найдет свое применение.

В качестве адъюванта для усиления противоопухолевого иммунного ответа были успешно использованы олигонуклеотиды, содержащие неметилованные цитозин-гуаниновые мотивы (CpG), известный лиганд для TLR9 (внутриклеточного белка, обеспечивающего функционирование врожденного иммунитета). Усиление иммунного ответа при использовании CpG происходит посредством активации ДК, способствуя выработке цитокинов Т-хелперами 1 (Th1), растворимых факторов, а также экспрессии МНС класса I, МНС класса II, CD80 и CD86 [39, 40]. Известно прямое действие CpG-олигодезоксинуклеотидов (ОДН) на клетки РМП. Даже однократное введение CpG-ОДН в мочевой пузырь мышей с развившимся РМП уменьшало размеры опухоли [41]. Одним из новых направлений в противоопухолевой терапии является использование ДК, обработанных CpG-ОДН [42]. Очевидно, в ближайшие годы ученые смогут широко внедрить в клиническую практику метод, основанный на введении онкологическим больным ДК, обработанных ОДН и CpG-ДНК [43].

Интересные исследования посвящены изучению белка микобактерий Antigen85A (*Ag85A*), относящегося к семейству *Ag85*, который участвует в синтезе миколиновой кислоты в клеточной стенке [44]. Показано, что *Ag85A* существенно индуцирует пролиферацию Т-хелперных клеток и усиление продукции цитокинов Th1 у людей, вакцинированных БЦЖ, и мышей, инфицированных микобактериями [45]. У мышей, вакцинированных плазмидной ДНК, содержащей ген *Ag85A*, регистрировали повышенное содержание в крови IL-2, IFN- γ и IgG2a, а также активность цитотоксических Т-лимфоцитов в ответ на микобактериальные белки БЦЖ, из которых *Ag85A* является основным компонентом [46, 47]. Иммунизация ДК, трансдуцированными с помощью ретровируса, несущего микобактериальный ген *Ag85A*, вызывает специфический клеточный иммунный ответ, включающий активность цитотоксических лимфоцитов [48].

Улучшить иммуногенность клеток опухоли, использующихся в технологическом процессе производства ДК-вакцины в качестве материала, активирующего ДК, можно путем радиационного облучения [49]. Этот прием способствует индукции высвобождения опухолевыми клетками ядерного негистонового белка HMGB-1, белка теплового шока HSP70 и других эндогенных «сигналов опасности», а также может регулировать экспрессию клетками антигенов МНС класса I, ICAM-1, VCAM-1 и других молекул адгезии. Все эти механизмы способствуют хемотаксису иммунных клеток к опухолевой ткани и имеют важное значение при разработке ДК-вакцин для активации врожденного и адаптивного иммунных ответов в организме больного.

Таким образом, на знании мишеней для воздействия вакцинотерапии при уротелиальной карциноме и способов усиления иммуногенности вакцин на основе ДК могут базироваться дальнейшие экспериментальные и клинические исследования ДК-вакцин при РМП.

Экспериментальные и клинические исследования дендритно-клеточных вакцин при раке мочевого пузыря

На сегодняшний день для лечения РМП разработан ряд противоопухолевых вакцин на основе ДК, которые проходят доклинические экспериментальные и клинические испытания.

Так, P. Zhang и соавт. провели исследование мышинной модели РМП [50]. Ученые использовали мышиную клеточную линию ДК DC 2.4, трансфицированную геном *Ag85A*, как субстрат для приготовления ДК-вакцины и изучили ее способность усиливать иммунный ответ против РМП. Были обнаружены цитотоксические свойства *Ag85A*-DC, нагруженных лизатом клеток опухоли мочевого пузыря линии MB49. Оценка иммунотерапевтического эффекта ДК-вакцины у мышей показала, что трансфицированные геном

Ag85A ДК экспрессировали высокие уровни ключевых поверхностных маркеров, таких как CD80, CD86 и антигены МНС класса II. Обнаружено существенное ингибирующее действие вакцины на рост опухоли. Количество опухолеинфильтрирующих CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток у вакцинированных *Ag85A*-DC мышей значительно увеличилось по сравнению с контрольными группами. Таким образом, на модели РМП была показана высокая активность ДК, модифицированных геном *Ag85A*, и разработанная технология может считаться перспективной в терапии РМП.

X.F. Xie и соавт. провели экспериментальные исследования вакцины, состоящей из ДК, нагруженных РТА опухолевых клеток, находящихся в состоянии радиационно-индуцированного апоптоза [49]. Установлен ингибирующий эффект такой ДК-вакцины на опухолевые клетки РМП у мышей линии C57BL/6. Проводили кокультивирование ДК в процессе созревания с предварительно облученными клетками опухоли мочевого пузыря линии MB49. Для моделирования РМП у самок мышей использовали ту же клеточную линию переходно-клеточного РМП MB49. Животных случайным образом распределяли в экспериментальную и контрольную группы. ДК-вакцину или забуференный фосфатом физиологический раствор вводили за 7 дней до инокуляции опухолевых клеток. Производили замеры объема опухолей и регистрировали выживаемость животных. По результатам исследования объем и средняя масса опухолей мышей, которым вводили РТА⁺ДК-вакцину, были значительно меньше, чем в контрольной группе. Срок жизни животных в экспериментальной группе также был более продолжительный, чем в контрольной. Кроме того, в экспериментальной группе у 2 мышей опухоли вообще не развились, эти животные были живы без признаков роста опухоли через 30 дней после подкожной инокуляции клеток MB49. Таким образом, данная ДК-вакцина оказывала противоопухолевый эффект и увеличивала выживаемость.

E. S. Hwang и соавт. провели исследование вакцины на основе ДК у пациентов мужского пола с РМП мышечно-неинвазивного типа [29]. Для этого ДК были нагружены антигенами подвергнутых ультрафиолетовому облучению аллогенных клеток РМП линии T24. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование аллогенной клеточной линии РМП в качестве источника опухолевых антигенов может генерировать специфический Т-клеточный ответ против аутологичных клеток РМП.

В России было проведено исследование адьювантной ИТ больных инвазивным переходно-клеточным РМП с применением вакцины на основе аутологичных ДК, нагруженных опухолевыми антигенами из аутологичного опухолевого материала. Показано, что использование этой вакцины в режиме внутрикожного введения больным, которым выполнено удаление первичного очага, не вызывает токсических или аутоиммунных

осложнений, способствует развитию клеточного иммунного ответа, который оценивался по наличию реакции гиперчувствительности замедленного типа и содержанию активированных цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов. Эти данные свидетельствуют об индукции системного иммунного ответа в отличие от сведений о пациентах контрольной группы, и могут указывать на перспективность данного метода лечения [6].

Также отечественными учеными отработаны оптимальные условия для сохранения жизнеспособности клеток уротелиальной карциномы в процессе их культивирования в целях создания на основе данного антигенного материала персонифицированных аутологичных противоопухолевых ДК-вакцин [16]. Определены параметры транспортировки и хранения биоматериала от больных РМП, нуждающихся в проведении ИТ ДК-вакцинами из отдаленных медицинских учреждений.

В качестве целевого антигена для активной специфической противоопухолевой иммунизации может быть рассмотрена молекула сурвивина с высокой степенью экспрессирующаяся в клетках уротелиальной карциномы [7]. Было продемонстрировано, что пептид сурвивин-2В80–88 может служить иммуногенной противоопухолевой вакциной при различных видах злокачественных образований, включая РМП [23]. На основе этих данных проведена I фаза клинических испытаний вакцинации пептидом сурвивин-2В80–88 в сочетании с IFN- α пациентов с распространенным или рецидивирующим уротелиальным раком, экспрессирующим сурвивин. Исследование показало иммунологическую эффективность данного типа вакцин в лечении пациентов с РМП, а также безопасность и хорошую переносимость данной терапии без серьезных побочных эффектов [51]. Весьма интересные исследования в области изучения и практического применения пептида сурвивин проведены К. Kikkawa и соавт. [52]. С помощью аденовирусного вектора, несущего ген сурвивина человека, получены активированные ДК, которые использовали для создания клонов сурвивинспецифических цитотоксических лимфоцитов, демонстрирующих мощный специфический цитотоксический ответ *in vitro*. Таким образом, использование сурвивина как мишени для различных иммунотерапевтических подходов становится многообещающей терапевтической стратегией в отношении РМП.

Уротелиальная карцинома характеризуется высоким уровнем экспрессии различных РТА [25], в связи с чем продолжают исследования вакцин, нацеленных на них при РМП. В экспериментальных исследованиях *in vitro*, проведенных Х. Z. Li и соавт., показана способность MAGE-3 сенсibilизированных ДК запускать иммунный ответ против клеток РМП линии В1U-87, экспрессирующих искомым антиген [53]. Введение ДК, активированных MAGE-3, вызывало существенное ингибирование роста опухоли на мышинной модели ксенотрансплантатов В1U-87.

Еще в 1997 г. результаты исследования Ф. Tanaka и соавт. показали успешную индукцию противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов синтетическим пептидом MAGE-3 с последовательностью *IMPKAGLLI*, который обладает высокой аффинностью к молекулам HLA-A24 [54]. Затем проведено пилотное исследование вакцины на основе ДК, в котором аутологичные ДК пациентов активировали с помощью антигена MAGE-A3, а далее вводили пациентам с метастатическим РМП. В исследование были включены 4 больных метастатическим РМП с установленным иммунофенотипом HLA-A24⁺MAGE-3⁺ [55]. Данные пациенты уже получили хирургическое лечение, химио- и лучевую терапию. Во время ДК-вакцинации не зафиксировано неблагоприятных побочных эффектов. У 1 пациента достигнут полный регресс опухоли, частичный регресс зарегистрирован у 2 больных, прогрессирование заболевания наблюдали в 1 случае. Таким образом, можно говорить о клинической эффективности данной вакцины.

По данным различных исследований установлено, что в 27,8–85,2 % случаев РМП обнаруживается онкобелок HER2, экспрессия которого коррелирует с метастатическим процессом и высоким уровнем летальности при этом заболевании [56]. В настоящее время опубликованы пилотные результаты II фазы рандомизированного клинического исследования аутологичной клеточной вакцины DN24–02 у больных HER2⁺ уротелиальной карциномой с высокой степенью риска развития рецидива [57]. Вакцина была изготовлена из аутологичных антигенпрезентирующих клеток, активированных антигеном BA7072, представляющим собой рекомбинантный белок HER2. Пациенты получали трехкратное введение вакцины DN24–02 с 2-недельными интервалами. Предварительные результаты показали, что у 30 пациентов, получивших полный курс вакцинаций, увеличился HER2-специфический иммунологический ответ и повысился уровень провоспалительных цитокинов. Также у 92,3 % больных, включенных в исследование, развились побочные эффекты терапии I и II степеней тяжести.

Другой вакциной, зарегистрированной на сайте ClinicalTrials.gov, мишенью которой служит HER2, является ДК-вакцина AdHER2/Neu, изготовленная в условиях GMP из криоконсервированных моноцитов пациентов путем трансдукции ДК вектором, несущим ген искомого антигена. Вакцину вводили внутривенно 6 раз каждые 4 нед. В настоящее время данная аутологичная ДК-вакцина проходит клинические испытания I фазы у больных с HER2⁺ метастатическими солидными опухолями, в том числе и РМП, в Национальных институтах здравоохранения США [58].

Заключение

В наши дни современная онкология характеризуется принципиально новым подходом к лечению злокачественных новообразований, базирующимся на изучении иммунной системы в условиях опухолевого роста, со-

здании и использовании противоопухолевых клеточных вакцин. ДК-вакцины — один из видов ИТ, направленной на распознавание и уничтожение опухолевых клеток. Публикуются многочисленные данные о проведении и/или завершении клинических испытаний I, II, III фаз для вакцин на основе аутологичных ДК. Разработка противоопухолевых ДК-вакцин для лечения злокачественных новообразований, в том числе РМП, — актуальная проблема, охватывающая множество аспектов, среди которых наиболее важными являются подбор потенциальных мишеней для воздействия вакцинотерапии, способы усиления иммуногенности вакцины, выбор технологии получения достаточного количества функциональных ДК для инициации клеточ-

ного иммунного ответа. При разработке ДК-вакцины особое внимание необходимо уделять использованию адъювантов, цитокинов, способов доставки антигенного материала для усиления активации зрелых ДК. Уже сегодня для лечения РМП разработаны и проходят доклинические экспериментальные и клинические исследования противоопухолевые вакцины на основе ДК, активированных различными способами. Однако таких разработок еще крайне мало. Недостаточно изучен иммуномодулирующий эффект вакцинотерапии, а также ее отдаленные результаты. Тем не менее клеточная ИТ на основе ДК при уротелиальной карциноме является весьма многообещающим направлением в лечении этой категории онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kamat A.M., Bağcıoğlu M., Huri E. What is new in non-muscle-invasive bladder cancer in 2016? *Turkish J Urol* 2017;43(1):9–13. DOI: 10.5152/tud.2017.60376. PMID: 28270945.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2017;67(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21387. PMID: 28055103.
- Cookson M.S., Herr H.W., Zhang Z.F. et al. The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15-year outcome. *J Urol* 1997;158(1):62–7. DOI: 10.1097/00005392-199707000-00017. PMID: 9186324.
- Chua K.L., Kusumawidjaja G., Murgic J., Chua M.L. Adjuvant treatment following radical cystectomy for muscle-invasive urothelial carcinoma and variant histologies: Is there a role for radiotherapy? *ESMO Open* 2017;1(6):e000123. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000123. PMID: 28848661.
- Долгих Д.В., Широкопад В.И., Долгих В.Т. Лечение больных раком мочевого пузыря. *Сибирский медицинский журнал* 2016;(1):5–12. [Dolgikh D.V., Shirokorad V.I., Dolgikh V.T. Treatment of patients with bladder cancer. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal* 2016;(1):5–12. (In Russ.)].
- Шоуа А.Б. Иммунотерапия с использованием дендритных клеток в лечении рецидивного инвазивного переходноклеточного рака мочевого пузыря. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. [Shoua A.B. Dendritic cell immunotherapy in treatment of invasive transitional cell carcinoma of the bladder. Author's abstract of thesis ... of candidate medical sciences. Moscow, 2009. (In Russ.)].
- Garg H., Suri P., Gupta J.C. et al. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int* 2016;16:49. DOI: 10.1186/s12935-016-0326-1. PMID: 27340370.
- Donin N.M., Lenis A.T., Holden S. et al. Immunotherapy for the treatment of urothelial carcinoma. *J Urol* 2017;197(1):14–22. DOI: 10.1016/j.juro.2016.02.3005. PMID: 27460757.
- Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer — a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11(3):153–62. DOI: 10.1038/nrurol.2014.15. PMID: 24492433.
- Brausi M., Witjes J.A., Lamm D. et al. A review of current guidelines and best practice recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the international Bladder Cancer Group. *J Urology* 2011;186(6):2158–67. DOI: 10.1016/j.juro.2011.07.076. PMID: 22014799.
- Muthigi A., George A.K., Brancato S.J., Agarwal P.K. Novel immunotherapeutic approaches to the treatment of urothelial carcinoma. *Ther Adv Urol* 2016;8(3):203–14. DOI: 10.1177/1756287216628784. PMID: 27247630.
- Zabolotneva A.A., Zhavoronkov A., Garazha A.V. et al. Characteristic patterns of microRNA expression in human bladder cancer. *Front Genet* 2013;3:310. DOI: 10.3389/fgene.2012.00310. PMID: 23316212.
- Massari F., Di Nunno V., Cubelli M. et al. Immune checkpoint inhibitors for metastatic bladder cancer. *Cancer Treat Rev* 2018;64:11–20. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.12.007. PMID: 29407369.
- Grülllich C. Immuntherapien ALS moderne tumor therapien. *Radiologie* 2017;57(10):822–5. DOI: 10.1007/s00117-017-0298-8. PMID: 28871357.
- Сальникова С.В., Славянская Т.А., Балдуева И.А. и др. Инновационные технологии в лечении рака мочевого пузыря. *Аллергология и иммунология* 2016;17(1):21–6. [Sal'nikova S.V., Slavyanskaya T.A., Baldueva I.A. et al. Innovation techniques in bladder cancer treatment. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology* 2016;17(1):21–6. (In Russ.)].
- Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В. Оптимизация условий получения жизнеспособной первичной культуры клеток уротелиальной карциномы. *Аллергология и иммунология* 2016;17(3):176–9. [Slavyanskaya T.A., Avdonkina N.A., Sal'nikova S.V. Optimization of the conditions for obtaining the viability of primary cell cultures of urothelial carcinoma. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology* 2016;17(3):176–9. (In Russ.)].
- Славянская Т.А., Авдонкина Н.А. Современные подходы и достижения в лечении рака мочевого пузыря. *Аллергология и иммунология* 2016;17(1):50–1. [Slavyanskaya T.A., Avdonkina N.A. Current approaches and accomplishments in bladder cancer treatment. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology* 2016;17(1):50–1. (In Russ.)].
- Thompson D.B., Siref L.E., Feloney M.P. et al. Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer. *Expert Rev Clin Immunol* 2015;11(2):265–79. DOI: 10.1586/1744666X.2015.983082. PMID: 25391391.
- Constantino J., Gomes C., Falcao A. et al. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20-years of clinical trials and

- future perspectives. *Transl Res* 2016;168:74–95.
DOI: 10.1016/j.trsl.2015.07.008.
PMID: 26297944.
20. Kitadani J., Ojima T., Iwamoto H. et al. Cancer vaccine therapy using carcinoembryonic antigen – expressing dendritic cells generated from induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2018;8(1):4569.
DOI: 10.1038/s41598-018-23120-z.
PMID: 29545628.
 21. Fernandez N.C., Lozier A., Flament C. et al. Dendritic cells directly trigger NK-cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999;5(4):405–11.
DOI: 10.1038/7403. PMID: 10202929.
 22. Hanke N., Alizadeh D., Katsanis E., Larmonier N. Dendritic cell tumor killing activity and its potential applications in cancer immunotherapy. *Crit Rev Immunol* 2013;33(1):1–21.
PMID: 23510023.
 23. Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L. et al. Anticancer mechanisms in two murine bone marrow-derived dendritic cell subsets activated with tlr4 agonists. *J Immunol* 2018;200(7):2656–69.
DOI: 10.4049/jimmunol.1701126.
PMID: 29500244.
 24. Sabado R.L., Balan S., Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res* 2017;27(1):74–95.
DOI: 10.1038/cr.2016.157.
PMID: 28025976.
 25. Sharma P., Shen Y., Wen S. et al. Cancer-testis antigens: expression and correlation with survivin in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5442–7.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0527.
PMID: 17000678.
 26. Hirohashi Y., Torigoe T., Maeda A. et al. An HLA-A24-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res* 2002;8(6):1731–9. PMID: 12060610.
 27. Ragai R.M., Robin D.H. Human cell culture protocols. 3rd edn. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2012. Pp. 31–43.
 28. Балдуева И.А., Славянская Т.А., Пипиа Н.П. и др. Особенности культивирования клеток уротелиальной карциномы, пригодных для создания персонифицированной дендритноклеточной вакцины против рака мочевого пузыря. II Российский онкологический форум с международным участием «Белые Ночи – 2016». Сборник тезисов, 2016. С. 228.
[Baldueva I.A., Slavyanskaya T.A., Pipia N.P. et al. Features of culture growth of urothelial carcinoma cells suitable for development of personalized dendritic cell vaccine against bladder cancer. II Russian Oncological Forum with International Participation “White Nights – 2016”. Abstracts, 2016. P. 228. (In Russ.)].
 29. Hwang E.C., Jung S.I., Lee H.J. et al. Generation of potent cytotoxic T lymphocytes against in male patients with non-muscle invasive bladder cancer by dendritic cells loaded with dying T24 bladder cancer cells. *Int Braz J Urol* 2017;43(4):615–27. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0274.
PMID: 28266813.
 30. Palucka A.K., Ueno H., Connolly J. et al. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 2006;29(5):545–57.
DOI: 10.1097/01.cji.0000211309.90621.8b. PMID: 16971810.
 31. Koido S. Dendritic-tumor fusion cell-based cancer vaccines. Ed T. Dittmar. *Int J Mol Sci* 2016;17(6):828.
<https://doi.org/10.3390/ijms17060828>.
 32. Troy A.J., Davidson P.J., Atkinson C.H., Hart D.N. CD1a dendritic cells predominate in transitional cell carcinoma of bladder and kidney but are minimally activated. *J Urol* 1999;161(6):1962–7.
PMID: 10332481.
 33. Engleman E.G. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Semin Oncol* 2003;30(3 Suppl 8):23–9.
PMID: 12881809.
 34. Aarntzen E.H., de Vries I.J., Göertz J.H. et al. Humoral anti-KLH responses in cancer patients treated with dendritic cell-based immunotherapy are dictated by different vaccination parameters. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(11):2003–11.
DOI: 10.1007/s00262-012-1263-z.
PMID: 22527252.
 35. Leonhartsberger N., Ramoner R., Putz T. et al. Antigen-independent immune responses after dendritic cell vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(6):897–903.
DOI: 10.1007/s00262-006-0245-4.
PMID: 17106716.
 36. Weide B., Pascolo S., Scheel B. et al. Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J Immunother* 2009;32(5):498–507.
DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068.
PMID: 19609242.
 37. Pizarro-Bauerle J., Maldonado I., Sosoniuk-Roche E. et al. Molluscan hemocyanins activate the classical pathway of the human complement system through natural antibodies. *Front Immunol* 2017;8:188. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00188. PMID: 28286504.
 38. Engell-Noerregaard L., Hansen T.H., Andersen M.H. et al. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(1):1–14.
DOI: 10.1007/s00262-008-0568-4.
PMID: 18719915.
 39. Jakob T., Walker P.S., Krieg A.M. et al. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998;161(6):3042–9.
PMID: 9743369.
 40. Sparwasser T., Koch E.S., Vabulas R.M. et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998;28(6):2045–54.
DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<#60;2045::AID-IMMU2045>#62;3.0.CO;2-8.
PMID: 9645386.
 41. Hegele A., Dalpke A., Heeg K. et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides reduce tumor burden after intravesical administration in an orthotopic murine bladder cancer model. *Tumor Biol* 2005;26(5):274–80.
 42. Arab S., Motamedi M., Khansari N. et al. Dendritic cell Maturation with CpG for tumor Immunotherapy. *Iran J Immunol* 2006;3(3):99–105. DOI: IJIV3i3A1.
PMID: 18698118.
 43. Беседнова Н.Н., Федеянина Л.Н. Противопоухоловое действие экзогенной дезоксирибонуклеиновой кислоты. Тихоокеанский медицинский журнал 2009;(3):12–8. [Besednova N.N., Fedyanina L.N. Anticancer effect of exogenous deoxyribonucleic acid. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal 2009;(3):12–8. (In Russ.)].
 44. Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T. et al. Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis. *Infection* 1997;27(6):5317:1420–2. PMID: 9162010.
 45. Huygen K., Content J., Denis O. et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996;2(8):893–8. PMID: 8705859.
 46. Borremans M., de Wit L., Volckaert G. et al. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1989;57(10):3123–30.
PMID: 2506131.
 47. Montgomery D.L., Huygen K., Yawman A.M. et al. Induction of humoral and cellular immune responses by vaccination with M. tuberculosis antigen 85 DNA. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 1997;43(3):285–92. PMID: 9193782.
 48. Nakano H., Nagata T., Suda T. et al. Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A. *Vaccine* 2006;24:2110–9.

49. Xie X.F., Ding Q., Hou J.G., Chen G. Inhibitory effects of a dendritic cell vaccine loaded with radiation-induced apoptotic tumor cells on tumor cell antigens in mouse bladder cancer. *Genet Mol Res* 2015;14(3):7548–55. DOI: 10.4238/2015.July.3.30. PMID: 26214433.
50. Zhang P., Wang J., Wang D. et al. Dendritic cell vaccine modified by *Ag85A* gene enhances anti-tumor immunity against bladder cancer. *Int Immunopharmacol* 2012;14(3):252–60. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.07.014. PMID: 22884511.
51. Tanaka T., Kitamura H., Inoue R. et al. Potential survival benefit of anti-apoptosis protein: survivin-derived peptide vaccine with and without interferon alpha therapy for patients with advanced or recurrent urothelial cancer – results from phase I clinical trials. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:262967. DOI: 10.1155/2013/262967. PMID: 24363758.
52. Kikkawa K., Fujii R., Kuramoto T. et al. Dendritic cells with transduced survivin gene induce specific cytotoxic T-lymphocytes in human urologic cancer cell lines. *Urology* 2009;74(1):222–8. DOI: 10.1016/j.urology.2008.12.045. PMID: 19285711.
53. Li X.Z., Han Y., Tian J. et al. Enhancement of dendritic cells with melanoma-associated antigen 3 for inducing cytotoxicity by cytotoxic T-lymphocytes on bladder cancer BIU-87 cells. *Genet Mol Res* 2016;15(3). DOI: 10.4238/gmr.15039001. PMID: 27706668.
54. Tanaka F., Fujie T., Tahara K. et al. Induction of antitumor cytotoxic T-lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24. *Cancer Res* 1997;57(20):4465–8. PMID: 9377553.
55. Nishiyama T., Tachibana M., Horiguchi Y. et al. Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res* 2001;7(1):23–31. PMID: 11205913.
56. Zhao J., Xu W., Zhang Z. et al. Prognostic role of HER2 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 2015;47(1):87–94. DOI: 10.1007/s11255-014-0866-z. PMID: 25384433.
57. Bajorin F., Sharma P., Gomella G. et al. NeuACT, a phase II randomized, open-label trial of DN24-02: updated analysis of HER2 expression, immune responses, product parameters, and safety in patients with surgically resected HER2+ urothelial cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(4):296.
58. Clinical Trials.gov identifier: NCT01730118.

Вклад авторов

А.С. Ильницкая: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

А.Б. Данилова: разработка дизайна исследования;

И.А. Балдуева: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

A.S. Ilnitskaya: reviewing of publications of the article's theme, article writing;

A.B. Danilova: developing the research design;

I.A. Baldueva: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов

А.С. Ильницкая: <https://orcid.org/0000-0001-8925-440X>

А.Б. Данилова: <https://orcid.org/0000-0003-4796-0386>

И.А. Балдуева: <https://orcid.org/0000-0002-7472-4613>

ORCID of authors

A.S. Ilnitskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8925-440X>

A.B. Danilova: <https://orcid.org/0000-0003-4796-0386>

I.A. Baldueva: <https://orcid.org/0000-0002-7472-4613>

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: 03.04.2018. **Принята к публикации:** 26.04.2018

Article received: 03.04.2018. **Accepted for publication:** 26.04.2018

Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека

Т.А. Богуш¹, С.А. Калюжный¹, М.Р. Четыркина², М.А. Ястребова², А.М. Щербаков¹,
И.А. Мамичев¹, А.А. Каменский²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Татьяна Анатольевна Богуш labmedchem@mail.ru

Введение. Клеточные культуры, используемые в качестве модельных при исследовании опухолей эпителиального происхождения, получают не только из солидных новообразований, но и из экстрацеллюлярных жидкостей. Известно, что диссеминация рака яичников по брюшине и дальнейший рост опухолевых клеток в асцитической жидкости сопровождаются активацией в них эпителиально-мезенхимального перехода и, следовательно, клеточные культуры, полученные из экстрацеллюлярных жидкостей, могут иметь молекулярный фенотип, отличный от первичного новообразования.

Цель исследования – оценка «сохранности» эпителиального фенотипа клеточных линий рака молочной железы и яичников.

Материалы и методы. В работе использованы клеточные линии, полученные из плевральной жидкости (MCF-7, T-47D), молочица (HBL-100), солидного опухолевого узла (BT-474, HCC1937) больных раком молочной железы и асцитической жидкости (SCOV-3) больной раком яичников. Экспрессию цитокератинов и виментина оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Результаты. Высокий уровень виментина в клетках, полученных из экстрацеллюлярных жидкостей, сохранялся (линия HBL-100), умеренно снижался (клетки SCOV-3) и даже утрачивался (клетки MCF-7 и T-47D). Клетки линии HCC1937, полученные из солидного узла с ожидаемо низкой экспрессией виментина, при росте в культуре приобрели молекулярный фенотип с высоким уровнем экспрессии этого мезенхимального маркера. В клетках рака молочной железы BT-474, полученных из солидного новообразования, по показателю экспрессии виментина обнаружено сохранение эпителиального фенотипа при росте *in vitro*.

Заключение. Оценка параметров экспрессии *de novo* мезенхимального белка виментина показала, что фенотип опухоли в организме не всегда реализуется в клетках, адаптированных к росту в культуре, и не всегда является «строго» эпителиальным, что необходимо учитывать при разного рода молекулярных исследованиях эпителиальных клеток *in vitro*.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, виментин, клеточная культура, рак молочной железы, рак яичников

Для цитирования: Богуш Т.А., Калюжный С.А., Четыркина М.Р. и др. Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(2):24–30.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-24-30

Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors

T.A. Bogush¹, S.A. Kaliuzhny¹, M.R. Chetyrkina², M.A. Yastrebova², A.M. Scherbakov¹, I.A. Mamichev¹, A.A. Kamensky²

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; Build. 12, 1 Leninskie gory, Moscow 119991, Russia

Background. Cell cultures used as a models in studies of epithelial tumors, are obtained not only from solid tumors, but also from extracellular fluids. It is known that dissemination of ovarian cancer in the peritoneum and further growth of tumor cells in ascetic liquid is accompanied with the activation of epithelial-mesenchymal transition, and, therefore, cell cultures derived from extracellular fluids can have a distinct molecular phenotype from primary tumors.

Objective: evaluation the “persistence” of epithelial phenotype in breast and ovarian cancer cell cultures.

Materials and methods. The cells obtained from pleural fluid (MCF-7, T-47D), colostrum (HBL-100), solid tumors (BT-474, HCC1937) of patients with breast cancer and ascitic fluid (SCOV-3) of patients with ovarian cancer. The expression of cytokeratins and vimentin was evaluated using a quantitative immunofluorescence method associated with flow cytometry.

Results. Vimentin expression in cells derived from extracellular fluids was not changed (line HBL-100), slightly decreased (SCOV-3 cells), or even was lost (MCF-7 and T-47D cells). HCC1937 cells obtained from solid tumor with expected low expression of vimentin acquired a molecular phenotype with a high expression of this mesenchymal marker. In breast cancer cells BT-474 derived from solid tumor a “persistence” of epithelial phenotype was discovered.

Conclusion. Quantitative assessment of the *de novo* expression of mesenchymal protein vimentin showed that the tumor phenotype within the organism is not always realized in cells adapted to growth in culture, and is not always «strictly» epithelial, and this evidence must be considered with different kinds of molecular studies of epithelial cells *in vitro*.

Key words: epithelial-to-mesenchymal transition, vimentin, cell culture, breast cancer, ovarian cancer

For citation: Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Chetyrkina M.R. et al. Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5 (2):24–30.

Введение

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – один из важнейших признаков агрессивности опухолевого процесса, который ассоциирован с повышением метастатического потенциала эпителиальных опухолевых клеток и снижением чувствительности к противоопухолевой терапии [1–3]. В ходе ЭМП нарушается экспрессия белков клеточных контактов [4–6], при этом выявляется экспрессия специфического мезенхимального белка виментина [5, 7]. Эти изменения обратимы [8, 9], и подавление экспрессии виментина индуцирует процесс мезенхимально-эпителиального перехода [10, 11]. Таким образом, экспрессия *de novo* мезенхимального белка виментина является признанным специфическим маркером изменения молекулярного фенотипа эпителиальных клеток в сторону мезенхимального [11, 12].

Ранее мы описали подобные изменения молекулярного фенотипа опухолевых клеток больных раком яичников (РЯ). Было показано, что в отличие от солидной формы, клетки рецидивного асцитного РЯ, помимо эпителиальных цитокератинов, экспрессируют общий лейкоцитарный антиген CD45 и маркер мезенхимальных клеток виментин [13]. Если принимать во внимание тот факт, что источником эпителиальных клеточных культур, которые широко используются в фундаментальных исследованиях, являются не только солидные новообразования, но и экстрацеллюлярные жидкости, представляется важной оценка «сохранности» эпителиального фенотипа при адаптации клеток к росту *in vitro*.

Цель исследования – количественная оценка *de novo* экспрессии виментина в культурах клеток, полученных из эпителиальных опухолей, различающихся формой роста в организме. Контролем для сравнения послужили клетки солидной и рецидивной асцитной опухолей больной серозным РЯ.

Материалы и методы

В качестве референсного контроля использовали клетки первичного серозного РЯ III стадии, полученные из хирургического биопсийного образца, и клетки из асцитической жидкости при диссеминации процесса по брюшине той же пациентки. Суспензии клеток инкубировали последовательно с первичными мышинными антителами к цитокератинам 5/6/8/17 (клоны PAN, AE1/AE3, MNF116; Dako, США), затем с вторичными антимышиными антителами DyLight488 (Abcam, Великобритания), затем с первичными кроличьими антителами к виментину (клон SP20; BIOCARE, США) и, наконец, с вторичными антикроличьими антителами

DyLight650 (Abcam, Великобритания). Для выведения из анализа дебриса и эритроцитов после завершения инкубации с вторичными антителами клетки инкубировали со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США).

Для исследования уровня экспрессии мезенхимального маркера виментина в культурах использовали клеточные линии, полученные из плевральной жидкости (MCF-7, T-47D), молозива (HBL-100), солидного опухолевого узла (BT-474, HCC1937) больных раком молочной железы (РМЖ) и асцитической жидкости (SCOV-3) больной РЯ. В каталоге Американской коллекции клеточных культур ATCC (США) клеточные линии числятся под номерами: НТВ-22 (MCF-7), НТВ-133 (T-47D), НТВ-124 (HBL-100), НТВ-20 (BT-474), CRL-2336 (HCC1937), НТВ-77 (SCOV-3).

Все клеточные линии, полученные из ATCC, до проведения экспериментов хранились в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Идентичность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (GORDIZ, Россия). Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США), 50 ед/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz, США) при температуре 37 °С, 5 % CO₂ и относительной влажности 80–85 %. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Следует отметить, что в процессе нашего исследования появились новые данные, касающиеся культуры HBL-100, в которой при проведении стандартных цитогенетических исследований (флуоресцентная гибридизация *in situ*, метод дифференциального G-окрашивания хромосом) обнаружили присутствие Y-хромосомы, вследствие чего данная культура не соответствует первичному описанию и снята с производства. Поскольку культуры содержат только клетки эпителиального происхождения, проводилось только одиночное окрашивание на виментин с использованием вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем DyLight650.

Показатели экспрессии цитокератинов и виментина оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, с применением разработанной ранее методики [14]. Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Регистрацию сигнала флуоресценции красителя DyLight488 проводили в канале FL-1, а для DyLight650 использовали канал FL-6. Уровень экспрессии –

количество специфически флуоресцирующих клеток (в процентах) по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами) — анализировали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8 (FlowJo LLC, США). Интенсивность экспрессии (в условных единицах) — отношение специфической интенсивности флуоресценции клеток после инкубации с первичными и вторичными антителами к аналогичному показателю в контроле после инкубации — только с вторичными антителами. Интегральный индекс экспрессии оценивали как произведение доли клеток, экспрессирующих виментин, и интенсивности экспрессии маркера. Точечные гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре получали с помощью программы WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, США).

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе исследования проведена сравнительная оценка уровня экспрессии мезенхимального маркера виментина в клетках, полученных из асцитической жидкости и солидного новообразования больной РЯ. Для точной оценки показателя *de novo* экспрессии виментина эпителиальные опухолевые клетки были предварительно окрашены антителами к цитокератинам и затем — к виментину. Метод двойного окрашивания биопсийных образцов антителами применяли в целях исключения из эксперимента мезенхимальных клеток, также экспрессирующих виментин, например фибробластов, которые обязательно присутствуют в биопсийных образцах в некотором количестве. Уровень ЭМП в исследуемой опухоли оценивали как долю клеток, коэкспрессирующих цитокератины и виментин, от общего количества эпителиальных клеток, включенных в анализ.

Точечные гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре представлены на рис. 1. На гистограммах № 1 продемонстрирована автофлуоресценция исследуемых клеток (левый нижний квадрант). Гистограммы № 2 показывают изменение исходной автофлуоресценции клеток после их инкубации с вторичными антителами, которая возникает в результате неспецифических взаимодействий вторичных антител с клетками (левый нижний квадрант). В дальнейшем этот анализ позволяет точно локализовать области расположения клеток, специфически окрашенных антителами к виментину (левый верхний квадрант, гистограммы № 3) или к цитокератинам (правый нижний квадрант, гистограммы № 4). При последовательном окрашивании этими антителами клеток одной клеточной суспензии (двойное флуоресцентное окрашивание, гистограммы № 5), в правом нижнем квадранте по-прежнему локализуются эпителиальные цитокератинположительные, а в верхнем левом — ви-

ментинположительные клетки. В правом верхнем квадранте при этом локализуются клетки, коэкспрессирующие виментин и цитокератины.

На рис. 1 представлен результат иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, полученных из образца солидной опухоли (образец 1), и асцитической жидкости (образец 2) той же больной РЯ. Отчетливо видна разница в уровне экспрессии виментина в эпителиальных опухолевых клетках в исследованных образцах: низкий (26 %) уровень маркера в первом случае и высокий (86 %) — во втором. Таким образом, продемонстрировано почти 4-кратное превышение показателя *de novo* экспрессии мезенхимального белка виментина в клетках РЯ, полученных из асцитической жидкости при диссеминации опухоли по брюшине, по сравнению с клетками солидного новообразования этой же больной. Эти результаты совпадают с ранее описанным наблюдением [13].

В следующей части работы проведено сравнение клеточных культур, полученных из эпителиальных опухолей, различающихся по форме роста в организме. Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции после иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к мезенхимальному маркеру виментин представлены на рис. 2.

Неожиданным оказались различия между клетками линий ВТ-474 и НСС1937, полученных из солидного узла РМЖ. В первом случае *de novo* экспрессия виментина оказалась минимальной, а во втором была выражена значительно. В клетках линии ВТ-474 по сравнению с клетками линии НСС1937 уровень экспрессии виментина оказался ниже более чем в 2 раза (29 % против 71 %), интенсивность экспрессии — в 3 раза (2,1 против 6,4), а интегральный индекс — более чем в 6 раз (0,7 против 4,8).

Отсутствие ассоциации молекулярного фенотипа клеток, растущих в культуре, относительно формы их существования в организме также продемонстрировано при исследовании культур клеток линий МСF-7 и Т-47D, полученных из плевральной жидкости больных РМЖ при диссеминации опухоли по плевре (см. рис. 2). Не отмечено ожидаемо высокой экспрессии виментина в клетках обеих культур. Уровень экспрессии маркера в клетках линий МСF-7 и Т-47D составил 8 и 20 %, интенсивность — 1,1 и 1,3, а интегральный индекс экспрессии 0,2 и 0,4 соответственно. Иными словами, судя по экспрессии виментина, молекулярный фенотип клеток линий МСF-7 и Т-47D максимально приближен к эпителиальному.

В то же время исследование культур клеток линий SCOV-3 и НBL-100, также полученных из экстрацеллюлярных жидкостей (асцитической жидкости и молозива), выявило в разной степени ярко выраженный фенотип ЭМП. Так, в клетках РЯ линии SCOV-3 уровень, интенсивность и интегральный индекс экспрессии составили 51 %, 3,6 и 1,9, а в клетках РМЖ линии НBL-100 — 75 %, 6,8 и 5,1 соответственно.

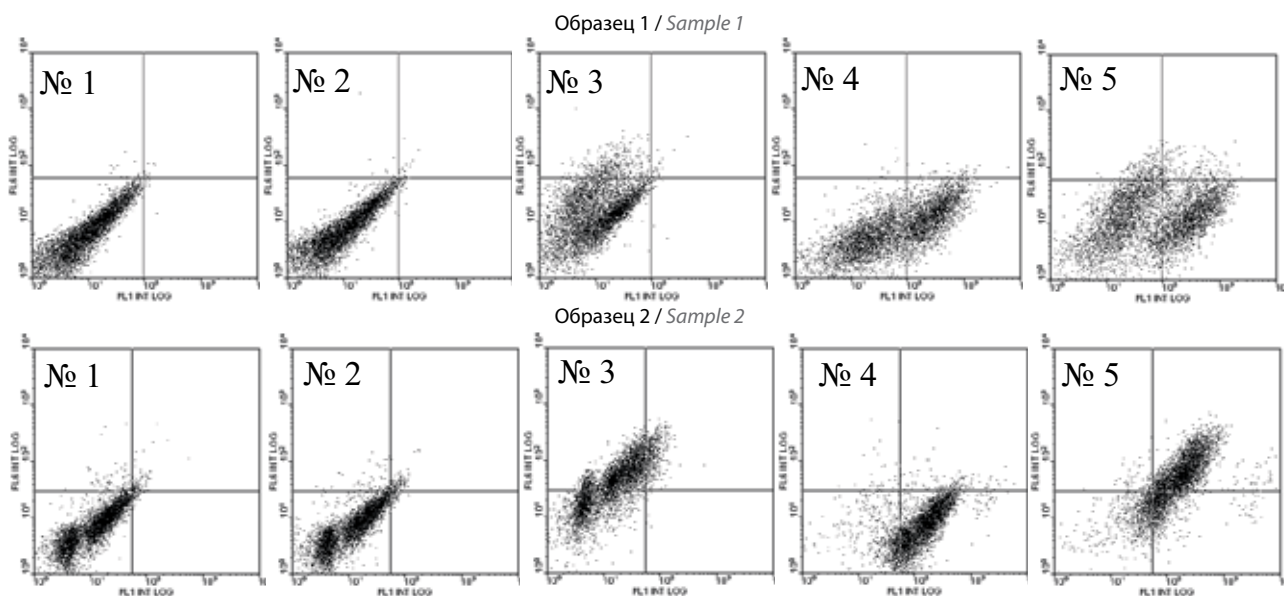


Рис. 1. Результаты последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к виментину и цитокератину. Образец 1 – клетки солидной опухоли; образец 2 – клетки, полученные из асцитической жидкости той же больной. Представлены точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: № 1 – автофлуоресценция (левый нижний квадрант); № 2 – инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (левый нижний квадрант); № 3 – клетки, экспрессирующие виментин (левый верхний квадрант); № 4 – клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант); № 5 – клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант) и коэкспрессирующие цитокератины и виментин (правый верхний квадрант)

Fig. 1. Results of sequential immunofluorescence staining of ovarian cancer cells with specific antibodies against vimentin and cytokeratin. Sample 1 – solid tumor cells; sample 2 – cells extracted from ascitic fluid of the same patient. Dot plots of cell distribution versus fluorescence intensity in different channels in flow cytometer: No. 1 – autofluorescence (bottom left quadrant); No. 2 – incubation with secondary antibodies conjugated with a fluorescent dye (bottom left quadrant); No. 3 – cells expressing vimentin (top left quadrant); No. 4 – cells expressing cytokeratins (bottom right quadrant); No. 5 – cells expressing cytokeratins (bottom right quadrant) and co-expressing cytokeratins and vimentin (top right quadrant)

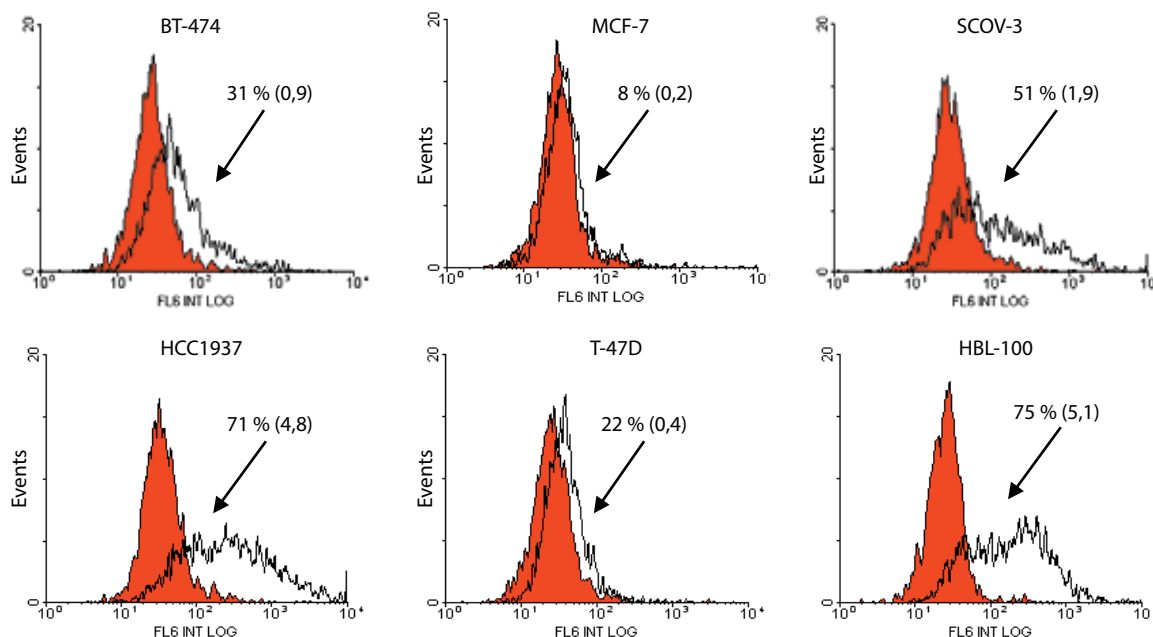


Рис. 2. Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от интенсивности клеточной флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании. По осям абсцисс – интенсивность специфической флуоресценции (условные единицы), по осям ординат – количество клеток; красные гистограммы – после инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль), прозрачные гистограммы – после инкубации с антителами к виментину; цифры на гистограммах – уровень экспрессии маркера (%), интенсивность окрашивания указана в скобках

Fig. 2. Examples of histograms demonstrating the dependence of cell distribution on cellular fluorescence intensity during immunofluorescent staining. X-axis – intensity of specific fluorescence (arbitrary units), Y-axis – number of cells; red histograms – after incubation with secondary antibodies conjugated with a fluorescent dye (control), transparent histograms – after incubation with antibodies against vimentin; numbers denote the level of marker expression (%), staining intensity is presented in brackets

Заключение

ЭМП, сопровождающийся изменением молекулярного фенотипа эпителиальных клеток, — важнейший фактор, повышающий метастатический потенциал опухоли. Эти изменения обратимы, и при определенных условиях возможен возврат клеток к исходному, эпителиальному молекулярному фенотипу. Признанный специфический маркер подобных изменений молекулярного фенотипа эпителиальных клеток — мезенхимальный белок виментин, который экспрессируется *de novo* при изменении молекулярного фенотипа эпителиальных клеток в сторону мезенхимального [11, 12].

Ранее мы показали, что у больных РЯ одним из факторов, индуцирующих процесс ЭМП, является изменение формы существования опухолевых клеток в организме. В подавляющем числе клеток, растущих в асцитической жидкости при диссеминации процесса по брюшине, выявлена высокая экспрессия виментина, чего не наблюдалось в солидных новообразованиях [13].

Если принимать во внимание последний факт и то, что источником культур опухолевых клеток, используемых в фундаментальных исследованиях, являются клетки, полученные как из солидных новообразований, так и из экстрацеллюлярных жидкостей, в настоящем исследовании проведена оценка «сохранности» исходного фенотипа опухоли при адаптации клеток к росту в культуре.

При использовании в качестве маркера уровня ЭМП белка виментин показано, что фенотип опухоли в организме не всегда сохраняется при адаптации к росту в культуре. При этом предсказать выявленные изменения не представляется возможным.

Так, ожидаемо высокий уровень виментина в клетках, полученных из экстрацеллюлярных жидкостей, может сохраняться (линия HBL-100), умеренно сни-

жаться (клетки SCOV-3) и даже утрачиваться (клетки MCF-7 и T-47D). Последние 2 примера указывают на возможность мезенхимально-эпителиального перехода, ассоциированного с адаптацией клеток к росту в культуре.

В то же время клетки линии HCC1937, полученные из солидного узла с ожидаемо низкой экспрессией виментина, при росте в культуре приобрели молекулярный фенотип с высоким уровнем экспрессии этого мезенхимального маркера, т. е. подверглись ЭМП. Согласно современной молекулярной классификации РМЖ линия HCC1937 относится к трижды негативному РМЖ и характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu. Трижды негативный рак, как правило, имеет агрессивное клиническое течение и плохо отвечает на стандартную химиотерапию. В образцах трижды негативного рака часто определяются признаки полного или частичного ЭМП, что подтверждено нашими данными об экспрессии виментина в линии HCC1937. Кроме того, в клетках HCC1937 была выявлена мутация BRCA1 5382C, а белок BRCA1, в свою очередь, является непосредственным регулятором молекулярных путей ЭМП [15].

И только в одном случае — в культуре клеток линии BT-474, полученных из солидного новообразования — по показателю экспрессии виментина отмечено сохранение эпителиального фенотипа при росте клеток в культуре.

Наши результаты согласуются с данными литературы о пластичности молекулярного фенотипа опухолевых клеток [16, 17] и с очевидностью демонстрируют необходимость контроля «сохранности» эпителиального фенотипа клеточных культур рака человека при разного рода молекулярных исследованиях эпителиальных клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Davidson B., Holth A., Hellesylt E. et al. The clinical role of epithelial mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Hum Pathol* 2015;46(1):1–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.004. PMID: 25455994.
- Choi Y., Lee H.J., Jang M.H. et al. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum Pathol* 2013;44(11):2581–9. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.07.003. PMID: 24055090.
- Heerboth S., Housman G., Leary M. et al. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* 2015;26(4):1–13. DOI: 10.1186/s40169-015-0048-3. PMID: 25852822.
- Savagner P., Kusewitt D.F., Carver E.A. et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 2005;202(3):858–66. DOI: 10.1002/jcp.20188. PMID: 15389643.
- Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139(5):871–90. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PMID: 19945376.
- Cao L., Shao M., Schilder J. et al. Tissue transglutaminase links TGF- β , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* 2012;31(20):2521–34. DOI: 10.1038/onc.2011.429. PMID: 21963846.
- Wu D.I., Liu L., Ren C. et al. Epithelial-mesenchymal interconversions and the regulatory function of the ZEB family during the development and progression of ovarian cancer. *Oncol Lett* 2016;11(2):1463–8. DOI: 10.3892/ol.2016.4092. PMID: 26893761.
- Nieto M.A. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science* 2013;342(6142):1–7. DOI: 10.1126/science.1234850. PMID: 24202173.
- Tsai J.H., Donaher J.L., Murphy D.A. et al. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 2012;22(6):725–36. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.09.022. PMID: 23201165.

10. Klymenko Y., Kim O., Stack M.S. Complex determinants of epithelial-mesenchymal phenotypic plasticity in ovarian cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9(8):1–32. DOI: 10.3390/cancers9080104. PMID: 28792442.
11. Hay E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233(3):706–20. DOI: 10.1002/dvdy.20345. PMID: 15937929.
12. Kidd M.E., Shumaker D.K., Ridge K.M. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50(1):1–6. DOI: 10.1165/rctmb.2013-0314TR. PMID: 23980547.
13. Богущ Т.А., Калюжный С.А., Дудко Е.А. и др. Молекулярные особенности асцитных клеток рака яичников, выявляемые при иммунофлуоресцентном анализе с привлечением проточной цитофлуориметрии. *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия* 2016;57(5):330–5. [Bogush T.A., Kalyuzhnyy S.A., Dudko E.A. et al. Molecular peculiarities of ascitic ovarian cancer cells revealing by immunofluorescence assay involving flow cytometry. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 2. Khimiya = Moscow State University Bulletin, Ser. 2, Chemistry* 2016;57(5):330–5. (In Russ.)].
14. Богущ Т.А., Шатунова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия* 2011;52(4):305–12. [Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A. et al. Quantitative immunofluorescent estimation of estrogen receptor β expression in human solid tumors using flow cytometry. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Ser. 2. Khimiya = Moscow State University Bulletin, Ser. 2, Chemistry* 2011;52(4):305–12. (In Russ.)].
15. Bai F., Chan H.L., Scott A. et al. BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development. *Cancer Res* 2014;74(21):6161–72. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1119. PMID: 25239453.
16. Strauss R., Li Z.Y., Liu Y. et al. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* 2011;6(1):1–20. DOI: 10.1371/journal.pone.0016186. PMID: 21264259.
17. Bezdniezhnykh N., Lykhova A., Semesiuk N. et al. Establishment and characterization of new breast and ovarian cancer cell lines as a model for studying cellular plasticity *in vitro*. *Exp Oncol* 2016;38(2):94–100. PMID: 27356577.

Вклад авторов

Т.А. Богущ: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

С.А. Калюжный: цитофлуориметрия, статистический анализ;

М.Р. Четыркина: цитофлуориметрия;

М.А. Ястребова, А.М. Щербаков: работа с клеточными культурами;

И.А. Мамичев: анализ полученных данных;

А.А. Каменский: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

T.A. Bogush: developing the research design, article writing, analysis of obtained data, reviewing of publications of the article's theme;

S.A. Kaliuzhny: flow cytometry; statistical analysis;

M.R. Chetyrkina: flow cytometry;

M.A. Yastrebova, A.M. Scherbakov: work with cell cultures;

I.A. Mamichev: analysis of the obtained data;

A.A. Kamensky: article writing, reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов

Т.А. Богущ: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

С.А. Калюжный: <https://orcid.org/0000-0002-8701-7707>

М.Р. Четыркина: <https://orcid.org/0000-0002-8524-2222>

М.А. Ястребова: <https://orcid.org/0000-0003-0405-9360>

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

И.А. Мамичев: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4502>

А.А. Каменский: <https://orcid.org/0000-0003-4912-922X>

ORCID of authors

T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

S.A. Kaliuzhny: <https://orcid.org/0000-0002-8701-7707>

M.R. Chetyrkina: <https://orcid.org/0000-0002-8524-2222>

M.A. Yastrebova: <https://orcid.org/0000-0003-0405-9360>

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

I.A. Mamichev: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4502>

A.A. Kamensky: <https://orcid.org/0000-0003-4912-922X>

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке средств Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-015-00422, 16-04-00347).
Financing. The study was performed with the support of the Russian Foundation for Basic Research (projects No. 18-015-00422, 16-04-00347).

Влияние пропионата на спектр высших жирных кислот в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Е.В. Каюкова, Т.Е. Белокриницкая, П.П. Терешков

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России;
Россия 672000 Чита, ул. Горького, 39А

Контакты: Елена Владимировна Каюкова elena_pochta22@mail.ru

Введение. Метаболическое перепрограммирование опухолевых клеток является одним из ведущих звеньев канцерогенеза.

Цель исследования – подтвердить гипотезу пропионатного пути синтеза высших жирных кислот (ВЖК) с нечетным числом атомов углерода при цервикальном раке.

Материалы и методы. В качестве образцов для исследования послужили биоптаты шейки матки, из которых выделяли суспензию опухолевых клеток (20 – рак шейки матки, 20 – цервикальная интраэпителиальная неоплазия, 18 – эндоцервикальный соскоб от здоровых женщин). Спектр ВЖК анализировали до и после 24-часовой инкубации с 50 мкмоль/л пропионовой кислоты и без нее с помощью метода газовой хроматографии.

Результаты. При злокачественной трансформации эпителия шейки матки в пределах одного органа метаболизм ВЖК разнонаправлен. В локусе цервикального рака, вероятнее всего, имеет место пропионатный путь синтеза ВЖК с использованием пальмитата. При тяжелой цервикальной дисплазии метаболизм ВЖК иной. Дефицит пальмитиновой кислоты можно объяснить синтезом стеариноата, который метаболизируется в олеиноат.

Заключение. Выявлена особенность биохимических изменений в пределах одного органа и одной патологии, что отражает этапность развития онкологического процесса.

Ключевые слова: рак шейки матки, атипичный метаболизм, жирные кислоты

Для цитирования: Каюкова Е.В., Белокриницкая Т.Е., Терешков П.П. Влияние пропионата на спектр высших жирных кислот в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(2):31–41.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-31-41

The influence of propionate on the spectrum of long-chain fatty acids in cervical cells during dis- and neoplastic transformation

E.V. Kayukova, T.E. Belokrinitskaya, P.P. Tereshkov

Chita State Academy of Medicine, Ministry of Health of Russia;
39A Gor'kogo St., Chita 672000, Russia

Background. Metabolic reprogramming of tumor cells is one of the leading links in carcinogenesis.

The objective to confirm the hypothesis of a propionate pathway for the synthesis of long-chain acids with an odd number of carbon atoms in cervical cancer.

Materials and methods. As samples for the study were biopsies of the colli uteri, from which a suspension of tumor cells was obtained (20 – cervical cancer, 20 – cervical intraepithelial neoplasia III grade, 18 – endocervical scraping from healthy women). The spectrum of fatty acids (FA) was analyzed before, after 24 hours incubation without and with 50 $\mu\text{mol/l}$ propionic acid by the gas chromatography method.

Results. Metabolism of FA is multidirectional in different locus in cervical cancer. In the locus of cervical cancer, most likely, there is a propionic pathway for the synthesis of FA using palmitate. In cervical intraepithelial neoplasia III grade, the metabolism of FA is another. Palmitic acid was used for synthesis stearate, which was metabolized to oleic acid.

Conclusion. The specificity of biochemical changes within one organ and one pathology has been revealed, which reflects the stage-by-stage development of the oncological process.

Key words: cervical cancer, atypical metabolism, fatty acid

For citation: Kayukova E.V., Belokrinitskaya T.E., Tereshkov P.P. The influence of propionate on the spectrum of long-chain fatty acids in cervical cells during dis- and neoplastic transformation. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018; 5(2):31–41.

Введение

Известно, что метаболическое перепрограммирование опухолевых клеток является одним из ведущих звеньев канцерогенеза [1]. В рамках изучения биохимического атипизма опухолевых клеток впервые в 1995 г. Б.С. Хышиктуев и соавт. предложили гипотезу пропионатного пути синтеза высших жирных кислот (ВЖК). Авторы выявили в конденсате выдыхаемого воздуха у больных раком легкого жирную кислоту с 19 атомами углерода (2-метилстеариновая), которая, по их мнению, синтезируется при участии пропионата [2].

В настоящей работе мы попытались подтвердить правомерность этой гипотезы для цервикального рака. Проблема рака шейки матки в современной онкологии является одной из самых актуальных с учетом широкой распространенности заболевания (1-е место в структуре онкогинекологической заболеваемости) и поражения женщин преимущественно трудоспособного и детородного возраста [3].

Цель исследования — оценить влияние пропионата *in vitro* на спектр ВЖК тканевых липидов эпителия шейки матки при предопухолевых заболеваниях и неоплазии экзоцервикса.

Материалы и методы

В нерандомизированное проспективное контролируемое исследование включены 58 женщин, проходивших обследование и лечение в Краевом онкологическом диспансере (г. Чита). Средний возраст пациенток составил $38,0 \pm 8,26$ года. Все обследуемые были информированы о проводимом исследовании и дали письменное согласие на участие в нем. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki, 1964, редакция 2013) с согласия Локального этического комитета Читинской государственной медицинской академии.

В качестве образцов исследования послужили фрагменты ткани шейки матки, полученные путем прицельной биопсии или интраоперационно с морфологическим контролем. В соответствии с данными гистологического исследования каждый образец ткани был разделен на 2 фрагмента: А — очаг поражения; Б — ткань без признаков дис- и неопластической трансформации. Нами выделены 3 клинические группы больных: I — пациентки с предраковыми заболеваниями шейки матки ($n = 20$, цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени); II — с диагнозом рак шейки матки ($n = 20$, гистологически подтвержденный плоскоклеточный рак стадии 0–Ib); контрольная — здоровые женщины ($n = 18$).

Для получения клеточной суспензии биоптат измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) с пробирками С-типа с использованием набора реагентов Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) согласно инструкции производителя.

Полученную суспензию клеток фильтровали через капроновый фильтр (размер ячеек 30 мкм) и промывали буфером autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Количество клеток определяли с помощью проточного цитофлуориметра FC500 (Beckman-Coulter, США) с использованием счетных флуоросфер FLOW-COUNT (Beckman-Coulter, США).

Для изучения спектра ВЖК липиды экстрагировали методом J. Folch и соавт. [4]. Спектр ВЖК анализировали на хроматографе «Кристалл-2000М» (Россия) с использованием плазменно-ионизационного детектора и капиллярной колонки FFAP (США). Список оцениваемых ВЖК приведен в табл. 1. Идентификацию и обсчет пиков осуществляли с помощью программно-аппаратного комплекса Analitika с использованием IBM Intel Pentium 4. Результаты исследования оценивали до и после 24-часовой инкубации с 50 мкмоль/л пропионовой кислоты и без нее (так называемая чистая, или изолированная, инкубация).

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы BIostat. Полученные результаты представлены как медиана с указанием 25-го и 75-го перцентилей. Использовали методы непараметрической статистики с применением критерия Вилкоксона для парных измерений и U-критерия Манна–Уитни с контрольной группой. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В здоровых клетках цервикального эпителия после инкубации с пропионатом суммарное содержание насыщенных жирных кислот не изменилось, но среди отдельных представителей жирных кислот этого класса наблюдались количественные колебания (табл. 2). Вклады $C_{16:0}$ и $C_{20:0}$ уменьшились на 6,4 и 11,3 % соответственно ($p < 0,001$), а концентрации $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $C_{17:0}$ и $C_{18:0}$ возросли (на 10,0; 9,4; 9,1 и 9,6 % соответственно) по сравнению с таковыми в условиях изолированной инкубации ($p < 0,001$). Доля моноеновых кислот после инкубации с пропионатом снизилась на 9,6 % ($p < 0,001$). Дефицит мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) был обусловлен, главным образом, уменьшением значений миристоолеиновой ($C_{14:1}$) и олеиновой ($C_{18:1}$) кислот на 40,8 и 11,0 % соответственно ($p < 0,001$). Уровень полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в здоровых клетках экзоцервикса под действием пропионата увеличился на 7 % за счет возрастающих концентраций $\omega 3$ -линоленовой, дигомо- γ -линоленовой, арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозапентаеновой кислот на 9,7; 9,5; 6,2; 9,6 и 9,7 % соответственно ($p < 0,001$) (см. табл. 2).

После инкубации с пропионовой кислотой во всех биоптатах I группы независимо от локализации по отношению к очагу поражения наблюдалось увеличение концентраций $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $C_{17:0}$, $C_{18:0}$, $C_{20:0}$ в среднем на 9,5 % для каждой из них в подгруппах IA и IB по сравнению с соответствующим показателем в условиях

Таблица 1. Оцениваемый спектр высших жирных кислот
Table 1. Evaluated spectrum of higher fatty acids

Шифр Code	Название Name
Насыщенные <i>Saturated</i>	
C _{14:0}	Миристиновая Myristic
C _{15:0}	Пентадекановая Pentadecanoic
C _{16:0}	Пальмитиновая Palmitic
C _{17:0}	Маргариновая Margaric
C _{18:0}	Стеариновая Stearic
C _{19:0}	α -метилстеариновая α -methylstearic
C _{20:0}	Арахидиновая Arachidic
Мононенасыщенные <i>Monounsaturated</i>	
C _{14:1}	Миристоолеиновая Myristoleic
C _{15:1}	Пентадекаеновая Pentadecenoic
C _{16:1}	Пальмитолеиновая Palmitoleic
C _{17:1}	Гептадекаеновая Heptadecenic
C _{18:1}	Олеиновая Oleic
Полиненасыщенные <i>Polyunsaturated</i>	
C _{18:2ω6}	Линолевая Linoleic
C _{18:3ω6}	γ -линоленовая γ -linoleic
C _{18:3ω3}	α -линоленовая α -linoleic
C _{20:3ω6}	Дигомо- γ -линоленовая Dihomo- γ -linoleic
C _{20:4ω6}	Арахидоновая Arachidonic
C _{20:5ω3}	Эйкозапентаеновая Eicosapentaenoic
C _{22:5ω3}	Докозапентаеновая Docosapentaenoic

изолированной инкубации ($p < 0,02$) (табл. 3). Исключение составила лишь C_{16:0}, вклад которой и в подгруппах IA и IB уменьшился на 3,5 и 6,4 % соответственно ($p < 0,02$). После воздействия C_{3:0} доля МНЖК сократилась на 4 и 7 % в подгруппах IA и IB соответственно

($p < 0,02$). Во всех биоптатах зарегистрировано повышение концентраций C_{14:1}, C_{16:1}, C_{17:1} в среднем на 9,5 % для каждой из них и снижение вклада C_{18:1} на 7,3 % ($p < 0,02$). В самом очаге поражения пул C_{15:1} был увеличен на 9,8 %, а в условно здоровых клетках снижен на 10,7 % ($p < 0,02$). Дефицит ПНЖК под действием пропионовой кислоты сокращался. В зоне предопухолевых изменений шейки матки и в клетках парадиспластической локализации под влиянием C_{3:0} пул ПНЖК увеличился на 11,0 и 9,1 % соответственно ($p < 0,02$).

В очаге поражения пул C_{18:3 ω 3} увеличился почти в 2 раза, концентрация остальных полиеновых кислот возросла в среднем на 9 % (см. табл. 3). В парадиспластических клетках динамика изменений состава ПНЖК была монотонной: рост уровней представителей ω 3-серий (C_{18:3 ω 3}, C_{20:5 ω 3}, C_{22:5 ω 3}) и ω 6-серий (C_{18:2 ω 6}, C_{18:3 ω 6}, C_{20:3 ω 6}, C_{20:4 ω 6}) – на 9 % для каждой из них ($p < 0,001$). Необходимо отметить положительную динамику уровня ВЖК с нечетным числом атомов углерода под действием пропионата в среднем на 10,7 и 10,3 % для подгрупп IA и IB соответственно ($p < 0,001$).

Под влиянием пропионовой кислоты в образцах цервикального рака доля насыщенных жирных кислот уменьшилась на 13 % ($p < 0,001$), но их уровень так и не достиг контрольной величины (табл. 4). Описанные изменения связаны со снижением количества пальмитиновой и стеариновой кислот на 30,3 и 27,4 % соответственно по отношению к показателям в условиях изолированной инкубации ($p < 0,001$). В паранеопластических клетках вклад насыщенных ЖК под действием пропионата не изменился, однако среди отдельных представителей данного класса соединений были выявлены количественные колебания, характерные и для злокачественного поражения. В очаге малигнизации под влиянием C_{3:0} увеличился пул насыщенных жирных кислот с нечетным числом атомов углерода в цепи, таких как пентадекановая и маргариновая, на 28 % для каждой из них ($p < 0,02$). Для клеток паранеопластической локализации эта тенденция сохранялась, но была менее выражена. Так, концентрации C_{15:0}, C_{17:0} после инкубации с C_{3:0} возросли на 17 и 18 % соответственно ($p < 0,02$). Кроме этого, интересным выглядит факт нарастания вклада C_{19:0} во всех биоптатах цервикального эпителия из II группы под влиянием пропионата: на 28,0 % для злокачественного поражения и 18,4 % для условно здоровых клеток ($p < 0,02$). Следует отметить, что в I группе эта кислота не верифицировалась, несмотря на изменение условий инкубации (добавление пропионата).

В отношении модификации пула насыщенных жирных кислот с четным числом атомов углерода под действием C_{3:0} при злокачественном поражении установлено, что концентрации миристиновой и арахидиновой кислот увеличились на 27,8 и 28,0 % в очаге неоплазии и на 17,5 и 18,7 % в условно здоровых клетках соответственно ($p < 0,02$), а пул пальмитиновой кислоты снизился в обеих подгруппах. Уровень

Таблица 2. Содержание высших жирных кислот в здоровых клетках шейки матки в зависимости от условий инкубации (Ме (25-й; 75-й перцентили)), %

Table 2. Higher fatty acid content in healthy cervix uteri cells depending on incubation conditions (Me (25th; 75th percentiles)), %

Шифр высших жирных кислот Higher fatty acid code	До инкубации Prior to incubation	После 24-часовой инкубации After 24-hour incubation	
		изолированной isolated	с пропионатом with propionate
Насыщенные жирные кислоты <i>Saturated fatty acids</i>			
C _{14:0}	2,75 (2,24; 3,09)	2,01* (1,75; 2,42)	2,21** (1,92; 2,65)
C _{15:0}	2,03 (1,94; 2,13)	1,59* (1,52; 1,66)	1,74** (1,67; 1,82)
C _{16:0}	24,47 (22,5; 26,4)	30,04* (28,45; 31,50)	28,1** (26,37; 29,71)
C _{17:0}	1,67 (1,59; 2,03)	1,31* (1,24; 1,59)	1,43 (1,37; 1,74)
C _{18:0}	9,02 (8,77; 12,01)	7,05* (6,04; 9,43)	7,73** (6,62; 10,34)
C _{19:0}	—	—	—
C _{20:0}	2,75 (2,14; 2,96)	2,65* (1,67; 2,32)	2,35** (1,863; 2,54)
Всего <i>Total</i>	42,7 (39,2; 48,6)	44,6* (40,7; 48,9)	43,6 (39,8; 48,8)
Мононенасыщенные жирные кислоты <i>Monounsaturated fatty acids</i>			
C _{14:1}	1,39 (1,37; 1,41)	2,01* (1,75; 2,42)	1,19** (1,18; 1,21)
C _{15:1}	0,80 (0,78; 0,89)	0,63* (0,61; 0,69)	0,69 (0,67; 0,76)
C _{16:1}	2,74 (2,29; 3,05)	2,14* (1,79; 2,38)	2,35** (1,96; 2,61)
C _{17:1}	2,51 (2,42; 2,60)	1,96* (1,89; 2,03)	2,15** (2,08; 2,23)
C _{18:1}	16,1 (13,7; 18,2)	23,47* (21,60; 25,14)	20,9** (18,9; 22,7)
Всего <i>Total</i>	23,5 (20,6; 26,2)	30,2* (27,6; 32,6)	27,3** (24,8; 29,5)
Полиненасыщенные жирные кислоты <i>Polyunsaturated fatty acids</i>			
C _{18:2ω6}	12,20 (10,34; 14,93)	9,54* (8,09; 11,68)	10,75** (8,87; 12,8)
C _{18:3ω6}	4,32 (3,74; 5,06)	3,38* (2,92; 3,95)	3,1** (3,20; 4,34)
C _{18:3ω3}	2,35 (2,09; 2,70)	1,84* (1,63; 2,11)	2,02** (1,79; 2,32)
C _{20:3ω6}	2,96 (2,47; 3,89)	2,32* (1,93; 3,04)	2,54** (2,12; 3,34)
C _{20:4ω6}	4,42 (3,68; 5,23)	3,46* (2,88; 4,09)	3,78** (3,16; 4,49)
C _{20:5ω3}	3,72 (3,08; 4,04)	2,91* (2,41; 3,16)	3,19** (2,64; 3,46)
C _{22:5ω3}	1,97 (1,67; 2,28)	1,54* (1,31; 1,78)	1,69** (1,43; 1,95)
Всего <i>Total</i>	31,9 (27,1; 38,1)	25* (21,2; 28,8)	26,8** (23,2; 32,7)
Высшие жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода <i>Higher fatty acids with odd number of carbon acids</i>	7,01 (6,73; 7,7)	5,5* (5,3; 6,0)	6,01 (5,8; 6,6)

*Достоверные различия между показателями в условиях до изолированной инкубации и после нее.

*Significant differences between the characteristics prior to isolated incubation and after it.

**Достоверные различия между показателями в разных условиях инкубации.

**Significant differences between the characteristics in different incubation conditions.

стеариновой кислоты варьировал в зависимости от подгрупп. Так, в малигнизированных участках эпителия под действием пропионата этот показатель снизился на 27,3 %, а в условно здоровых клетках увеличился на 18,0 %.

Что касается МНЖК, то после воздействия C_{3:0} их доля сократилась на 9 % в клетках паранеопластической локализации и очаге рака ($p < 0,020$) (см. табл. 4).

В локусе злокачественной трансформации под влиянием пропионата наблюдалось снижение пула

Таблица 3. Содержание высших жирных кислот в клетках шейки матки различной локализации при диспластической трансформации в зависимости от условий инкубации (Me (25-й; 75-й перцентили), %)

Table 3. Higher fatty acid content in cervix uteri cells of varying localization with dysplastic transformation depending on incubation conditions (Me (25th; 75th percentiles), %)

Шифр высших жирных кислот Higher fatty acid code	IA IA		IB IB	
	До инкубации Prior to incubation		После 24-часовой инкубации After 24-hour incubation	
	изолированной isolated	с пропионатом with propionate	изолированной isolated	с пропионатом with propionate
Насыщенные жирные кислоты Saturated fatty acids				
C _{14:0}	3,36 (3,03; 3,69)	2,53* (2,28; 2,78)	2,77** (2,50; 3,04)	3,20* (2,68; 3,73)
C _{15:0}	1,97 (1,92; 2,02)	1,48* (1,44; 1,52)	1,62** (1,58; 1,67)	1,25* (0,97; 1,17)
C _{16:0}	32,6 (30,98; 34,20)	36,9* (35,7; 38,1)	35,6** (34,3; 37,0)	29,6* (27,9; 31,2)
C _{17:0}	2,97 (2,47; 3,47)	2,23* (1,86; 2,61)	2,45** (2,04; 2,86)	1,58* (1,30; 1,90)
C _{18:0}	10,70 (7,24; 14,20)	8,08 (5,45; 10,71)	8,86** (5,97; 11,70)	13,08* (11,80; 14,30)
C _{19:0}	—	—	—	—
C _{20:0}	1,13 (1,07; 1,20)	0,85* (0,80; 0,90)	0,93** (0,88; 0,99)	1,47* (1,28; 1,67)
Всего Total	52,7 (46,7; 58,8)	52,1 (47,5; 56,6)	52,2 (47,3; 57,3)	50,2 (45,9; 54,0)
Мононенасыщенные жирные кислоты Monounsaturated fatty acids				
C _{14:1}	1,17 (1,16; 1,18)	0,88* (0,88; 0,89)	0,97** (0,96; 0,97)	1,07* (0,97; 1,17)
C _{15:1}	2,45 (1,95; 2,95)	1,84* (1,47; 2,22)	2,02** (1,61; 2,43)	1,68* (1,24; 1,52)
C _{16:1}	4,13 (3,32; 4,94)	3,11* (2,50; 3,72)	3,41** (2,74; 4,07)	2,51* (1,75; 3,26)
C _{17:1}	1,30 (1,09; 1,51)	0,98* (0,82; 1,14)	1,07** (0,90; 1,25)	1,48* (1,43; 1,54)
C _{18:1}	21,3 (19,8; 22,8)	28,5* (27,3; 29,6)	26,4** (25,1; 27,6)	23,7* (20,8; 26,6)
Всего Total	31,5 (28,4; 34,6)	35,3* (32,9; 37,5)	33,9** (31,3; 36,3)	30,4* (26,2; 34,1)

Окончание табл. 3.
End of table 3

Шифр высших жирных кислот Higher fatty acid code	IA IA		IB IB			
	До инкубации Prior to incubation		После 24-часовой инкубации After 24-hour incubation			
	изолированной isolated	с пропионатом with propionate	изолированной isolated	с пропионатом with propionate		
Полиненасыщенные жирные кислоты <i>Polyunsaturated fatty acids</i>						
C _{18:2ω6}	9,03 (8,58; 9,48)	6,79* (3,45; 7,13)	7,45** (7,08; 7,82)	8,82 (8,64; 9,0)	6,75* (6,61; 6,89)	7,37** (7,22; 7,52)
C _{18:3ω6}	1,27 (1,09; 1,45)	0,96* (0,82; 1,09)	1,05** (0,90; 1,20)	3,49 (2,75; 4,23)	2,67* (2,10; 3,24)	2,92** (2,30; 3,54)
C _{18:3ω3}	0,46 (0,23; 0,69)	0,35* (0,18; 0,52)	0,68** (0,19; 0,57)	1,90 (1,64; 2,16)	1,46* (1,26; 1,66)	1,59** (1,37; 1,81)
C _{20:3ω6}	1,35 (1,14; 1,56)	1,02* (0,86; 1,18)	1,12** (0,94; 1,29)	2,61 (1,57; 3,66)	2,0* (1,2; 2,8)	2,19** (1,31; 3,06)
C _{20:4ω6}	1,81 (1,35; 2,27)	1,36* (1,01; 1,71)	1,49** (1,11; 1,87)	3,57 (3,02; 4,12)	2,73* (2,31; 3,15)	2,98** (2,52; 3,44)
C _{20:5ω3}	2,32 (2,04; 2,61)	1,75* (1,53; 1,96)	1,91** (1,68; 2,15)	3,32 (2,85; 3,79)	2,54* (2,18; 2,90)	2,78** (2,38; 3,17)
C _{22:5ω3}	0,60 (0,39; 0,82)	0,45* (0,29; 0,61)	0,50** (0,32; 0,67)	2,02 (1,74; 2,30)	1,55* (1,33; 1,76)	1,69** (1,45; 1,92)
Всего <i>Total</i>	16,8 (14,8; 18,9)	12,7* (8,1; 14,2)	14,1** (12,2; 15,6)	25,6 (22,2; 29,3)	19,7* (17,0; 22,4)	21,5** (18,6; 24,5)
Высшие жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода Higher fatty acids with odd number of carbon acids	8,70 (7,43; 10,0)	6,5* (5,6; 7,5)	7,2** (6,1; 8,2)	7,5 (6,8; 8,1)	6,0* (4,9; 6,1)	6,2** (5,7; 6,8)

* Достоверные различия между показателями в условиях до изолированной инкубации и после нее.

* Significant differences between the characteristics prior to isolated incubation and after it.

** Достоверные различия между показателями в разных условиях инкубации.

** Significant differences between the characteristics in different incubation conditions.

Примечание. Здесь и в табл. 4: А — очаг предопухолового поражения шейки матки; Б — ткань без признаков диспластической трансформации.

Note. Here and in Table 4: A — premalignant lesion in the cervix uteri; B — tissue without signs of dysplastic transformation.

Таблица 4. Содержание высших жирных кислот в клетках шейки матки различной локализации при неопластической трансформации в зависимости от условий инкубации (Me (25-й; 75-й перцентили), %)

Table 4. Higher fatty acid content in cervix uteri cells of varying localization with neoplastic transformation depending on incubation conditions (Me (25th; 75th percentiles), %)

Шифр высших жирных кислот Higher fatty acid code	IIA IIA		IIB IIB			
	До инкубации Prior to incubation	После 24-часовой инкубации After 24-hour incubation		До инкубации Prior to incubation	После 24-часовой инкубации After 24-hour incubation	
		изолированной isolated	с пропионатом with propionate		изолированной isolated	с пропионатом with propionate
Насыщенные жирные кислоты <i>Saturated fatty acids</i>						
C _{14:0}	4,22 (4,02; 4,78)	5,47* (5,21; 6,20)	6,99** (6,66; 7,93)	2,50 (2,30; 3,45)	1,94* (1,78; 2,67)	2,28** (2,10; 3,15)
C _{15:0}	1,55 (1,54; 1,60)	2,01* (1,99; 2,07)	2,57** (2,55; 2,65)	1,29 (1,20; 1,51)	1,0* (0,93; 1,17)	1,17** (1,10; 1,37)
C _{16:0}	29,9 (28,5; 31,7)	23,8* (22,1; 26,3)	16,6** (14,3; 19,7)	26,5 (25,5; 29,9)	31,8* (31,1; 34,5)	28,6** (27,7; 31,7)
C _{17:0}	2,01 (1,47; 2,38)	2,61* (1,91; 3,08)	3,33** (2,44; 3,95)	4,10 (3,95; 4,35)	3,17* (3,05; 3,36)	3,74** (3,60; 3,96)
C _{18:0}	13,8 (11,9; 14,3)	17,9* (15,5; 18,5)	13,0** (10,9; 14,3)	12,60 (9,14; 13,30)	9,74* (7,07; 10,30)	11,50** (8,83; 12,10)
C _{19:0}	3,91 (3,53; 4,33)	5,07* (4,58; 5,61)	6,49** (5,86; 7,18)	0,98 (0,79; 1,12)	0,76 (0,61; 0,87)	0,90** (0,72; 1,02)
C _{20:0}	1,63 (1,47; 1,68)	2,11* (1,90; 2,17)	2,70** (2,43; 2,78)	1,18 (0,83; 1,64)	0,91* (0,64; 1,27)	1,08** (0,76; 1,49)
Всего Total	57,0 (52,4; 60,8)	59,0 (51,3; 63,9)	51,4** (45,1; 58,5)	49,2 (43,7; 55,3)	49,3 (45,2; 54,1)	49,3 (46,9; 54,8)
Мононенасыщенные жирные кислоты <i>Monounsaturated fatty acids</i>						
C _{14:1}	1,31 (1,22; 2,19)	5,47* (5,20; 6,20)	2,17** (2,02; 3,64)	1,12 (1,08; 1,19)	0,86* (0,83; 0,92)	1,02** (2,10; 3,15)
C _{15:1}	0,67 (0,66; 0,68)	0,87 (0,86; 0,88)	1,12** (1,10; 1,12)	0,44 (0,39; 0,54)	0,34 (0,30; 0,42)	0,40** (0,35; 0,49)
C _{16:1}	3,95 (3,56; 4,94)	5,12* (4,61; 6,40)	6,55** (5,90; 8,19)	5,44 (4,29; 6,01)	4,21 (3,32; 4,65)	4,96** (3,91; 5,48)
C _{17:1}	0,57 (0,52; 0,86)	0,74* (0,67; 1,11)	0,95** (0,86; 1,43)	1,21 (0,81; 1,39)	0,94* (0,63; 1,07)	1,10** (0,74; 1,27)
C _{18:1}	24,2 (22,9; 25,3)	16,6* (14,9; 17,9)	15,0 (10,4; 17,2)	20,6 (19,6; 22,6)	27,3* (26,5; 28,8)	23,2** (22,3; 25,0)
Всего Total	30,7 (28,9; 34,0)	28,9* (26,2; 32,5)	25,8** (20,3; 31,6)	28,8 (27,3; 31,7)	33,7* (31,6; 35,9)	30,7** (29,4; 35,4)

Окончание табл. 4.
End of table 4

Шифр высших жирных кислот Higher fatty acid code	IIА IIA		IIБ IIB	
	До инкубации Prior to incubation		После 24-часовой инкубации After 24-hour incubation	
	изолированной isolated	с пропионатом with propionate	изолированной isolated	с пропионатом with propionate
Полиненасыщенные жирные кислоты <i>Polyunsaturated fatty acids</i>				
C _{18:2ω6}	4,65 (3,95; 5,02)	6,03* (5,12; 6,51)	7,71** (6,55; 8,33)	6,72 (6,14; 7,08)
C _{18:3ω6}	1,95 (1,54; 1,99)	2,53* (2,0; 2,58)	3,24** (2,56; 3,30)	4,36 (3,78; 4,49)
C _{18:3ω3}	0,65 (0,16; 0,82)	0,85 (0,21; 1,06)	1,09** (0,27; 1,36)	1,69 (1,26; 1,83)
C _{20:3ω6}	1,32 (1,85; 1,68)	1,71* (1,11; 2,18)	2,19** (1,42; 2,79)	0,80 (0,65; 1,07)
C _{20:4ω6}	2,21 (1,62; 2,35)	2,86* (2,10; 3,04)	3,66** (2,69; 3,89)	1,91 (1,84; 2,75)
C _{20:5ω3}	2,08 (1,76; 2,31)	2,70 (2,28; 2,99)	3,45** (2,91; 3,83)	3,71 (3,52; 3,83)
C _{22:5ω3}	0,29 (0,22; 0,81)	0,38 (0,28; 1,05)	0,49** (0,36; 1,34)	1,42 (1,32; 1,82)
Всего <i>Total</i>	13,2 (11,1; 15,0)	17,1* (13,1; 19,4)	21,8** (16,8; 24,8)	20,6 (18,5; 22,9)
Высшие жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода <i>Higher fatty acids with odd number of carbon acids</i>	8,71 (7,72; 9,86)	11,1* (10,0; 12,8)	14,5** (12,8; 16,3)	8,02 (7,14; 8,91)
				6,13** (5,60; 6,45)
				3,97** (3,45; 4,09)
				1,54** (1,15; 1,67)
				0,73** (0,59; 0,98)
				1,74** (1,67; 2,51)
				3,38** (3,21; 3,49)
				1,30** (1,20; 1,66)
				18,8** (16,9; 20,9)
				7,31** (6,51; 8,11)

* Достоверные различия между показателями в условиях до изолированной инкубации и после нее.

*Significant differences between the characteristics prior to isolated incubation and after it.

** Достоверные различия между показателями в разных условиях инкубации.

**Significant differences between the characteristics in different incubation conditions.

миристоолеиновой кислоты на 60,3 % ($p < 0,02$). Концентрация остальных представителей МНЖК, таких как $C_{15:1}$, $C_{16:1}$, $C_{17:1}$, в клетках этой локализации возросла на 28,7; 27,9 и 28,3 % соответственно ($p < 0,02$).

В паранеопластических клетках динамика изменения профиля МНЖК была аналогична, за исключением уровней миристоолеиновой и олеиновой кислот (см. табл. 4). Вклад первой под влиянием $C_{3:0}$ увеличился на 18,6 %, а второй – уменьшился на 14,9 % ($p < 0,02$).

Под действием пропионата дефицит ПНЖК уменьшился на 27,4 и 17,5 % в очаге злокачественного поражения и в условно здоровых клетках соответственно ($p < 0,05$) за счет увеличения доли представителей как $\omega 3$ -, так и $\omega 6$ -серий кислот, в среднем на 28 % в очаге поражения и на 20 % на периферии органа для каждой из них ($p < 0,02$). При этом в очаге рака максимально выросла концентрация $C_{22:5\omega 3}$ (на 29 %), а в парадиспластических клетках – пул $C_{20:5\omega 3}$ (на 25 %).

Сравнительный анализ межгрупповых показателей состава ВЖК под влиянием пропионата представлен на рис. 1.

После инкубации с $C_{3:0}$ только в клетках цервикального рака зарегистрировано снижение уровня насыщенных жирных кислот ($p < 0,001$), что связано со значительным уменьшением уровня пальмитиновой и стеариновой кислот на 30,3 и 10,0 % соответственно ($p < 0,001$). В очаге предрака, парадиспластических, паранеопластических и здоровых клетках снижалась концентрация только $C_{16:0}$, а пул остальных насыщенных

аналогов увеличивался. Причем достоверных различий внутри I клинической группы между их концентрациями не было, а максимальных значений они достигали в подгруппах ПА и ПБ.

Интересным выглядит факт нарастания вклада $C_{19:0}$ во всех биоптатах II группы под влиянием пропионата ($p < 0,02$). Следует отметить, что в I и контрольной группах эта кислота не верифицировалась.

Пул МНЖК под влиянием пропионата во всех исследуемых группах снижался, имея минимальное значение в локусе цервикального рака, что на 6,7; 3,8 и 1,8 % меньше, чем в подгруппах IA, IB и ПБ соответственно. Полученные результаты связаны с уменьшением концентраций $C_{14:1}$ и $C_{18:1}$ в локусе цервикального рака на 60,3 и 9,6 % по сравнению с контролем соответственно ($p < 0,001$).

Вклад ПНЖК под действием $C_{3:0}$ повышался во всех группах, достигая максимума в очаге неоплазии. Данный эффект связан с тотальным увеличением концентрации всех представителей полиеновых кислот на 10 % в среднем в локусе предрака и парадиспластических клетках (за исключением эйкозатриеновой кислоты, уровень которой увеличился в 2 раза в биоптатах подгруппы IB), на 29 % – в очаге рака и на 18 % – в парадиспластических клетках ($p < 0,001$).

Обсуждение

При злокачественной трансформации цервикального эпителия в пределах одного органа метаболизм ВЖК разнонаправлен.

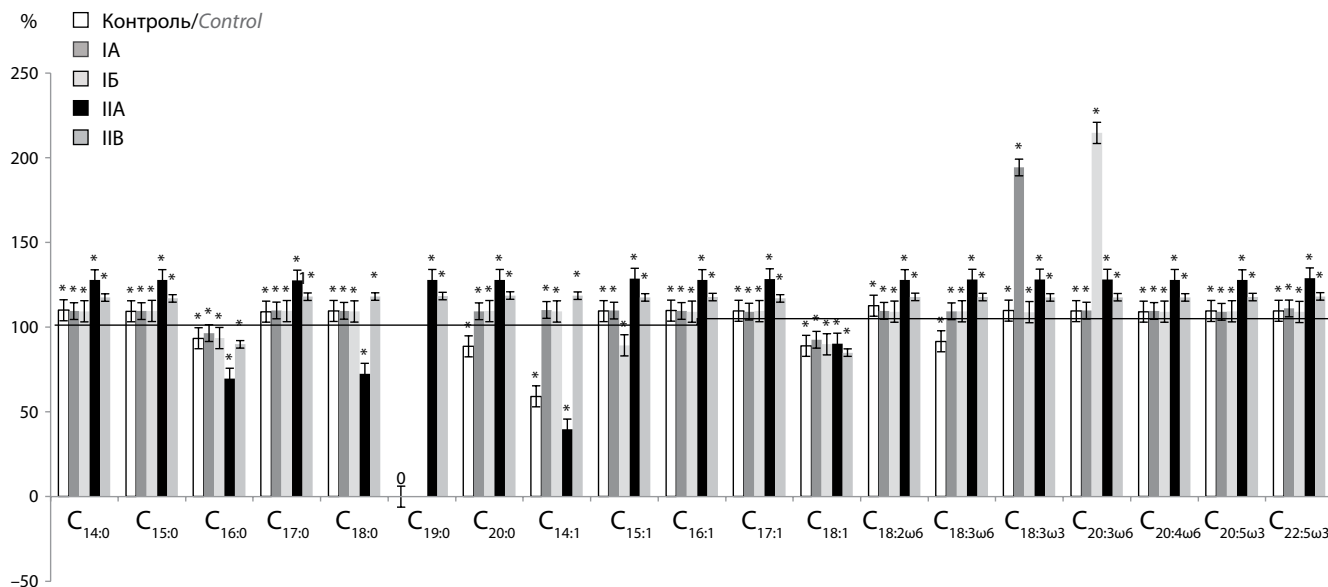


Рис. 1. Изменения пула высших жирных кислот в клетках шейки матки различной локализации при дис- и неопластической трансформации под влиянием пропионата. А – очаг предопухолового поражения шейки матки; Б – ткань без признаков диспластической трансформации; 100 % – показатели при изолированной инкубации.

Fig. 1. Changes in higher fatty acid pool in cervix uteri cells of different localizations with dys- and neoplastic transformation under the effect of propionate. А – premalignant lesion in the cervix uteri; В – tissue without signs of dysplastic transformation; 100 % corresponds to characteristics in isolated incubation.

*Достоверные различия между парными показателями одной группы в разных условиях инкубации.

*Significant differences between pairwise characteristics within a group in different incubation conditions.

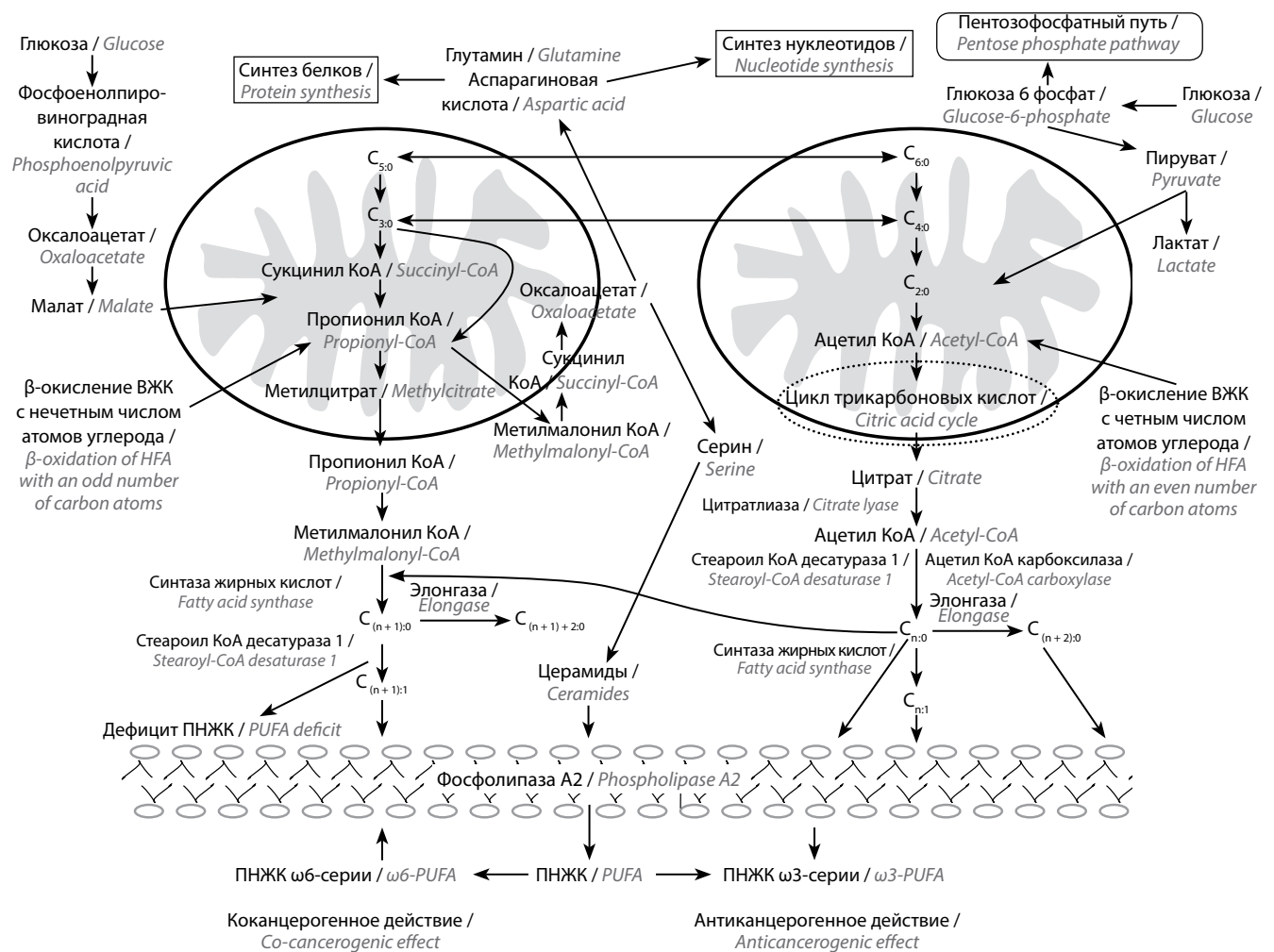


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая возможные механизмы модификации жирнокислотного состава мембран клеток экзоцервикса при злокачественной трансформации. ВЖК – высшие жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; n – четное число атомов углерода
Fig. 2. Diagram illustrating the possible mechanisms of modification of fatty acid content in exocervical cell membranes during malignant transformation. HFA – higher fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids; n – number of carbon atoms

В клетках цервикального рака, вероятнее всего, имеет место пропионатный путь синтеза ВЖК с использованием пальмитата, что подтверждает факт детекции $C_{19:0}$ на фоне снижения пула $C_{16:0}$. Полученные результаты согласуются с данными литературы, указывающими на возможность реализации синтеза ВЖК с нечетным числом атомов углерода с использованием пропионата при раке легкого и обострении псориаза [1, 5]. Дефицит $C_{16:0}$ и $C_{18:0}$ на фоне высоких концентраций $C_{20:0}$, $C_{14:1}$, $C_{15:1}$, $C_{16:1}$, $C_{17:1}$ может указывать на интенсификацию реакций элонгации и десатурации в раковых клетках, что также подтверждено при других онкологических заболеваниях [6–7].

Известно, что метаболит пропионата – метилмалонил КоА – является ингибитором β -окисления жирных кислот, вероятно поэтому было зарегистрировано относительное накопление полиеновых аналогов во всех патологических группах [1].

При тяжелой цервикальной дисплазии метаболизм жирных кислот иной. Пальмитиновая кислота использовалась на образование стеариноата, который метаболлизировался в олеиноат.

При анализе результатов собственного исследования и данных литературы мы сформировали патогенетическую модель модификации состава ВЖК в клетках цервикального эпителия при злокачественной трансформации (рис. 2).

Заключение

Резюмируя, можно отметить особенности выявленных биохимических изменений в процессе цервикального канцерогенеза, что, с одной стороны, отражает этапность развития онкологического процесса, с другой – служит отражением «мозаичного» фенотипа опухолевых клеток.

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

1. Мартынов В.А. Об изменениях структуры и биохимических параметров в клетках под влиянием раковой трансформации и их восстановлении под влиянием средств, не обладающих противоопухолевой активностью. Вестник Тамбовского университета 2003;8(2):315–22. [Martynov V.A. On changes of cellular structure and biochemical parameters under malignant transformation and their restoration under the influence of agents without antitumor activity. Vestnik Tambovskogo Universiteta = Tambov University Review 2003;8(2):315–22. (In Russ.)].
2. Патент Российской Федерации на изобретение № 2117290. Бюл. 95109305/14. Хышиктеев Б.С., Хышиктеева Н.А., Иванов В.Н. Способ дифференциальной диагностики заболеваний бронхолегочной системы. [Patent of the Russian Federation for an invention No. 2117290. Bulletin 95109305/14. Khyshiktuev B.S., Khyshiktueva N.A., Ivanov V.N. Method of differential diagnosis of bronchopulmonary disorders. (In Russ.)].
3. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin 2018;68(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21442. PMID: 29313949.
4. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957;226(1):497–509. PMID: 13428781.
5. Караваева Т.М., Фалько Е.В., Медведев К.К. Взаимоотношения между уровнем высших жирных кислот в крови и эпидермисе при псориазе. Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 55-летию ЧГМА. Чита, 2008. РИЦ, 2008. С. 181–182. [Karavaeva T.M., Fal'ko E. V., Medvedev K.K. Relationship between the levels of higher fatty acids in blood and epidermis in psoriasis. Abstracts of the All-Russia Scientific and Practical Conference Dedicated to 55th Anniversary of Chita State Academy of Medicine. Chita, 2008. RITS, 2008. Pp. 181–182. (In Russ.)].
6. Byberg L., Kilander L., Warensjö Lemming E. et al. Cancer death is related to high palmitoleic acid in serum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men. Am J Clin Nutr 2014;99 (3):551–8. DOI: 10.3945/ajcn.113.065714. PMID: 24368438.
7. Igal R.A. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. Carcinogenesis 2010;31(9):1509–15. DOI: 10.1093/carcin/bgq131. PMID: 20595235.

Вклад авторов

Е.В. Каюкова: анализ полученных данных, написание статьи;

Т.Е. Белокрынская: обзор публикаций по теме статьи;

П.П. Терешков: разработка дизайна исследования, выполнение лабораторной части исследования.

Authors' contributions

E.V. Kayukova: analysis of the obtained data, article writing;

T.E. Belokrinitskaya: reviewing of publications of the article's theme;

P.P. Tereshkov: developing the research design, implementation of the laboratory part of the study.

ORCID авторов

Е.В. Каюкова: <https://orcid.org/0000-0001-5231-9273>

Т.Е. Белокрынская: <https://orcid.org/0000-0002-5447-4223>

П.П. Терешков: <https://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

ORCID of authors

E.V. Kayukova: <https://orcid.org/0000-0001-5231-9273>

T.E. Belokrinitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-5447-4223>

P.P. Tereshkov: <https://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Государственного задания по научно-исследовательской работе на 2018 г.

Financing. The study was conducted under the State Task for Scientific Research in 2018.

Статья поступила: 22.02.2018. **Принята к публикации:** 15.05.2018

Article received: 22.02.2018. **Accepted for publication:** 15.05.2018

Селективное ингибирование *KRAS*-сигнального каскада при комбинированном воздействии низких доз рапамицина и паклитаксела *in vivo*

М. Н. Юрова¹, Д. Р. Сафина², И. В. Мизгирев¹

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

²ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук; Россия, 123182 Москва, площадь акад. И. В. Курчатова, 2

Контакты: Мария Николаевна Юрова yutarni@gmail.com

Введение. Применение соединений, потенциально способных блокировать функционирование сигнального каскада онкогена *KRAS*, является одним из перспективных направлений современной онкофармакологии.

Цель исследования — изучить эффекты комбинированного действия рапамицина (*RAP*) и паклитаксела (*PAC*) на трансгенной линии зебрафиш (*Danio rerio*), характеризующейся постоянной экспрессией в клетках эпидермиса онкогена *KRASV12*, конъюгированного с зеленым флуоресцентным белком (green fluorescent protein, *GFP*). Эта линия имеет измененный фенотип, обусловленный гиперплазией кератиноцитов и флуоресценцией в них *GFP*-репортера.

Материалы и методы. Эмбрионы рыб в возрасте 6 ч помещали в среду с добавлением 0,1 % раствора диметилсульфоксида (контроль) и различных доз исследуемых препаратов или их комбинаций. Время инкубации составило 72 ч, после чего проводили количественную оценку интенсивности флуоресценции *GFP*-репортера в клетках эпидермиса с помощью компьютерной морфометрии.

Результаты. При воздействии *RAP* выраженность фенотипических изменений уменьшалась вплоть до полной нормализации фенотипа в дозе 50–400 нмоль. *PAC* в дозе 50–250 нмоль не оказывал токсического влияния на развитие эмбрионов, однако дозозависимо повышал уровень флуоресценции репортера, что свидетельствует об усилении экспрессии онкогена *KRAS*. Воздействие низких доз *RAP* (10–25 нмоль), а также *PAC* (10 нмоль) по отдельности не оказывало статистически значимого влияния на выраженность трансформированного фенотипа. В то же время использование различных комбинаций низких доз этих препаратов (*RAP* в дозе 10–25 нмоль в сочетании с *PAC* в дозе 10–50 нмоль) существенно снижало регистрируемый уровень флуоресценции, полностью нормализуя фенотип трансгенных рыб.

Заключение. Выявлено взаимное потенцирующее действие низких доз *RAP* и *PAC*, приводящее к избирательному ингибированию сигнального каскада онкогена *KRAS*, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований комбинации этих препаратов для таргетной терапии опухолей.

Ключевые слова: *KRAS*, зебрафиш, *Danio rerio*, рапамицин, паклитаксел, таргетная терапия, *mTOR*

Для цитирования: Юрова М. Н., Сафина Д. Р., Мизгирев И. В. Селективное ингибирование *KRAS*-сигнального каскада при комбинированном воздействии низких доз рапамицина и паклитаксела *in vivo*. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(2):42–9.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-42-49

Selective inhibition of *KRAS* signaling by combination of low dose rapamycin and paclitaxel *in vivo*

M. N. Yurova¹, D. R. Safina², I. V. Mizgirev¹

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

²Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences; 2 Acad. I. V. Kurchatova Sq., Moscow 123182, Russia

Background. Therapy with compounds potentially capable to block *KRAS* oncogene signaling pathway is perspective direction in modern oncopharmacology.

The aim of current study was to investigate effects of the combined treatment with rapamycin (*RAP*) and paclitaxel (*PAC*) in transgenic zebrafish (*Danio rerio*) with constant expression of mutant *KRASV12* oncogene conjugated to green fluorescent protein (*GFP*) in epidermal cells. This strain has a modified phenotype due to epidermal hyperplasia and expression of *GFP* reporter at skin of embryos and adult fish.

Materials and methods. Fish embryos 6 hpf were exposed to 0.1 % DMSO solution (control) and various doses of the drugs or combinations thereof. *GFP* expression in epidermal cells was morphometrically measured at 72 hpf.

Results. Dose-related decrease in phenotypic changes up to complete epidermal normalization under *RAP* 50–400 nM treatment was observed. Treatment with nontoxic for embryos doses of *PAC* 50–250 nM increased fluorescence level in a dose-dependent manner, indicating an activation of *KRAS* signaling. Using of lower doses of *RAP* (10 and 25 nM) or *PAC* (10 nM) had no statistically significant effect on expression of transformed phenotype. Whereas combined treatment (*RAP* 10–25 nM and *PAC* 10–50 nM) dramatically decreased level of epidermal fluorescence and completely normalized phenotype of transgenic fish.

Conclusions. Thus, mutual potentiating effect of RAP and PAC in low doses which leads to selective inhibition of the KRAS signaling pathway was revealed, indicating the prospect of further studies of these drugs combination for targeted cancer therapy.

Key words: KRAS, zebrafish, *Danio rerio*, rapamycin, paclitaxel, targeted therapy, mTOR

For citation: Yurova M.N., Safina D.R., Mizgirev I.V. Selective inhibition of KRAS signaling by combination of low dose rapamycin and paclitaxel in vivo. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(2):42–9.

Введение

Более 30 % злокачественных опухолей человека имеют мутации в генах семейства RAS. Из них чаще в опухолевых клетках выявляются активирующие мутации в кодонах 12, 13 и 61 онкогена *KRAS*. Активация этого онкогена выявлена более чем в 60 % карцином поджелудочной железы, 50 % опухолей толстой кишки и щитовидной железы, 30 % опухолей легких, а также с меньшей частотой в опухолях других локализаций [1]. Как правило, эти новообразования плохо поддаются лечению современными цитостатическими препаратами. По этой причине альтернативным направлением терапии опухолей, имеющих мутации в гене *KRAS*, становится применение таргетных препаратов, действие которых направлено на избирательное ингибирование отдельных компонентов MEK/ERK и PI3K/AKT сигнальных каскадов, участвующих в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и выживания клеток. Результаты клинических исследований, проводившихся в этом направлении, показали, что использование ингибиторов mTOR (рапамицина (RAP) и его производных – рапалогов) оказывает противоопухолевое действие на злокачественные новообразования молочной железы, печени, нейроэндокринной и лимфатической систем [2, 3]. Более того, в ряде экспериментов показана способность RAP тормозить развитие индуцированных химическими канцерогенами опухолей у грызунов и снижать частоту возникновения спонтанных опухолей у мышей различных линий [4].

Ингибиторы mTOR показали свою эффективность и в качестве агентов, способных усиливать противоопухолевое действие некоторых цитостатических препаратов, используемых при лечении различных типов злокачественных новообразований [5, 6]. Одним из таких препаратов является паклитаксел (PAC), широко применяемый для терапии рака молочной железы, яичников, легкого и пищевода. Основными механизмами действия PAC считаются стабилизация микротрубочек и блокирование митоза с последующей гибелью клеток. Кроме того, имеются данные об индуцирующем действии PAC на сигнальный каскад Raf/ERK [7], что может способствовать усилению пролиферации и предотвращению запуска программы апоптоза. С другой стороны, комбинирование PAC с ингибиторами сигнального каскада PI3K/AKT способствует резкому усилению апоптоза и остановке роста клеточных линий карциномы яичников [8].

Однако механизм, лежащий в основе синергического действия PAC и RAP на сигнальный каскад онко-

гена *KRAS*, еще не полностью понятен и требует дальнейшего изучения с использованием в том числе новых моделей. Одной из таких моделей, популярность которой растет на протяжении последних десятилетий, является рыба *Danio rerio*, или зебрафиш, удачно сочетающая возможность проведения исследований *in vivo*, т. е. на целом организме, с простотой и эффективностью использования клеточных систем *in vitro*. Более того, наличие сходства между опухолями рыб и млекопитающих на гистологическом и молекулярном уровнях позволило успешно использовать зебрафиш для моделирования различных процессов, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований человека [9]. В данной работе была использована созданная в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова трансгенная линия зебрафиш tg(krt8:EGFP-KRAS^{V12}), несущая мутантную форму гена *KRAS* под управлением промотора цитокератина 8(krt8), активность которого у рыб проявляется главным образом в клетках покровного эпителия [10]. Эта трансгенная линия имеет выраженные фенотипические отличия от рыб дикого типа и характеризуется гиперплазией клеток эпидермиса, а также экспрессией в них зеленого флуоресцентного белка-репортера GFP (green fluorescent protein). Указанные биологические особенности позволяют позиционировать линию рыб tg(krt8:EGFP-KRAS^{V12}) в качестве перспективной тест-системы для высокопроизводительного скрининга ингибиторов сигнального каскада онкогена *KRAS*, а также для выявления новых комбинаций уже известных ингибиторов и цитостатических препаратов, способных при сочетанном применении направленно усиливать эффективность терапии опухолей, ассоциированных с онкогенами семейства RAS.

Цель работы – изучение влияния комбинированного действия различных доз RAP и PAC на выраженность гиперпластического трансформированного фенотипа (ТФ) эпидермиса трансгенной линии зебрафиш, характеризующейся постоянной экспрессией онкогена *KRAS* в кератиноцитах.

Материалы и методы

Используемые линии зебрафиш. Для улучшения визуализации ТФ в работе использованы рыбы двойной трансгенной линии tg(krt8:EGFP-KRAS^{V12});tg(krt8:EGFP) (далее – линия KRAS^{V12}), характеризующейся постоянной совместной экспрессией в клетках эпидермиса онкогена *KRAS^{V12}* (активирующая мутация в кодоне 12), конъюгированного с флуоресцентным GFP-репортером, и дополнительного GFP-репортера, предназначенного

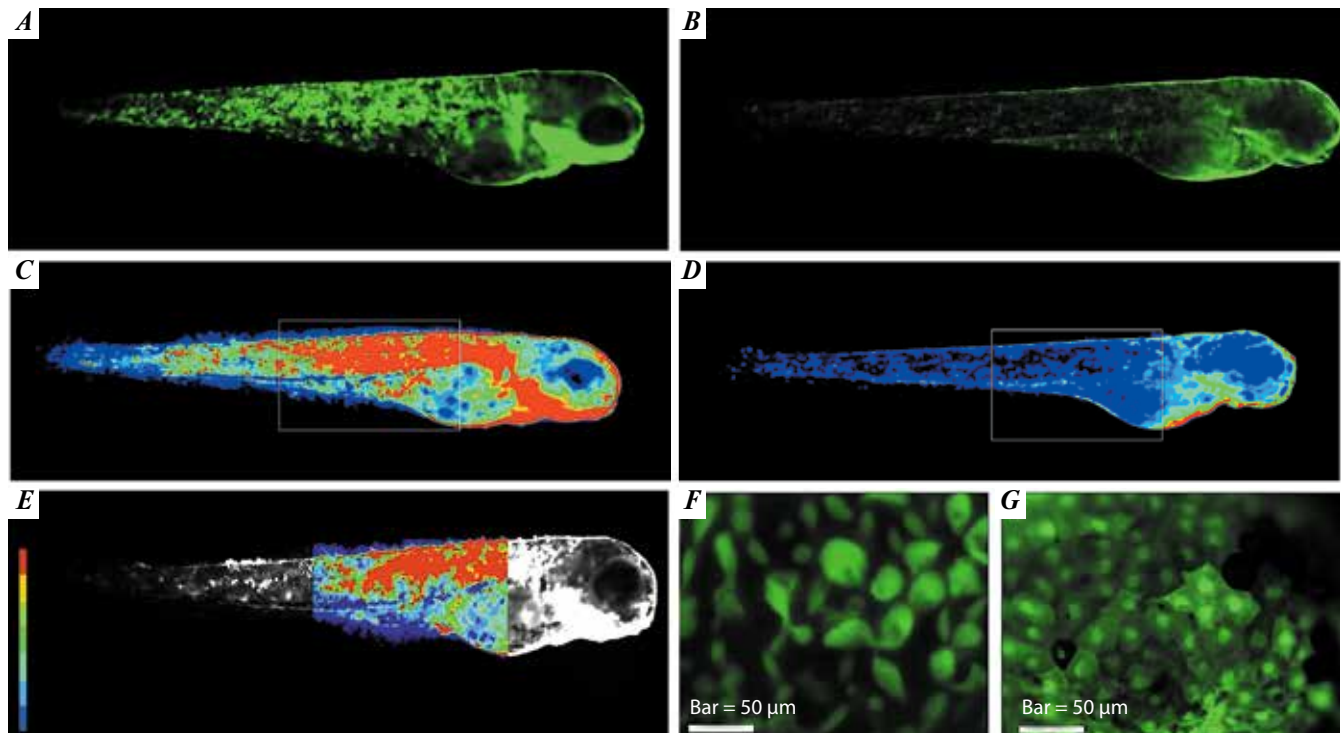


Рис. 1. Морфологические особенности эмбрионов трансгенной *tg(krt8:EGFP-KRASV12);tg(krt8:EGFP)* линии зебрафиш. Внешний вид трансгенного *KRASV12* (A) и контрольного *tg(krt8:EGFP)* (B) эмбрионов в возрасте 72 ч под флуоресцентным микроскопом. Окраска псевдоцветами флуоресцентных изображений *KRASV12* (C) и контрольного (D) эмбрионов. Рамкой выделена область, предназначенная для количественного анализа уровня выраженности трансформированного фенотипа. Красный и желтый цвета соответствуют трансформированному фенотипу и отсутствуют в выделенной области у контрольных рыб. Совмещение изображения окрашенной в псевдоцвета измеряемой области с флуоресцентным монохромным изображением *KRASV12* эмбриона (E) для визуализации геометрической формы и топографии анализируемого участка. Флуоресцентные изображения эпидермальных клеток *KRASV12* (F) и контрольного (G) эмбрионов. Эпидермис контрольных рыб состоит из полигональных клеток, расположенных в виде однослойного плоского эпителия с относительно равномерным уровнем экспрессии GFP-репортера, тогда как кератиноциты *KRASV12* эмбрионов характеризуются округлой формой, пониженной адгезией и повышенным уровнем флуоресценции GFP

Fig. 1. Morphological features of transgenic *tg(krt8:EGFP-KRASV12);tg(krt8:EGFP)* zebrafish embryos. *KRASV12* (A) and control *tg(krt8:EGFP)* (B) embryos at the age of 72 hpf under a fluorescent microscope. Fluorescent images of *KRASV12* (C) and control *tg(krt8:EGFP)* (D) embryos converted to pseudocolors. Level of transformed phenotype expression was analyzed in framed area. Transformed phenotype was characterized by red and yellow pseudocolors lacked in control fish. Pseudocolor area combined with the fluorescent monochrome image of *KRASV12* embryo (E) showing geometric shape and topography of analyzed zone. Fluorescent images of epidermal cells of *KRASV12* (F) and control (G) embryos. The epidermis of control fish consist of a monolayer of squamous polygonal cells with a relatively homogeneous level of GFP expression, whereas keratinocytes of *KRASV12* embryos are characterized by rounded shape, reduced adhesion and increased GFP fluorescence

для усиления интенсивности свечения кератиноцитов (рис. 1A). Все эксперименты выполнены на гетерозиготных эмбрионах, полученных при скрещивании рыб линии *KRASV12*, гомозиготных по обоим трансгенным локусам, с рыбами дикого типа. Трансгенная линия *tg(krt8:EGFP)*, имеющая исходную морфологию эпидермиса, была использована в качестве фенотипического контроля при оценке нормализующего действия препаратов (рис. 1B). Рыбы содержались в проточной аквариумной системе при температуре 28,5 °С. Световой режим в соответствии с международным стандартом поддерживался в соотношении 14 ч/10 ч свет/темнота. Кормление производили 1 раз в сутки науплиями *Artemia salina* и сухим кормом Tetramin (Tetra, Германия). Все исследования проводили в соответствии с правилами Европейской Конвенции о защите позвоночных животных (СДСЕ № 123) и нормами биоэтики (<https://cioms.ch/images/stories/CIOMS/IGP2012.pdf>).

Биоимиджинг и количественная оценка экспрессии трансгена. Оценку уровня экспрессии ТФ выполняли на оцифрованных изображениях трансгенных эмбрионов. Для этого эмбрионы в возрасте 72 ч были обездвижены в 0,0015 % растворе трикаина (Sigma, США) и помещены в агарозные лунки на дне чашек Петри (6 см), заполненных жидкой средой. Оцифровку проводили под флуоресцентным микроскопом Axioskop FL 40 (Carl Zeiss, Германия) с использованием набора фильтров для GFP-репортера и высокочувствительной камеры RT-3 Slider (Diagnostic Instruments, США). Для количественной оценки уровня экспрессии ТФ монохромные 8-битные (256 градаций серого) изображения были окрашены в псевдоцвета, соответствующие 7 диапазонам яркости (рис. 1C, D). Стандартно для анализа экспрессии ТФ был выбран участок тела эмбриона, имеющий четкие анатомические границы и локализованный между серединой желточного мешка и урогенитальным отверстием (рис. 1E). Площадь

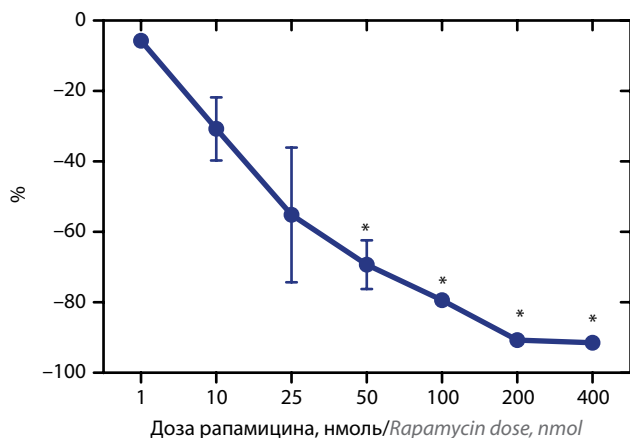


Рис. 2. Дозозависимое торможение выраженности трансформированного фенотипа под воздействием рапамицина (RAP), оцениваемое по снижению площади (в пикселях) наиболее ярких областей в процентах относительно контроля (DMCO). *Различия с контролем статистически достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 2. Dose-dependent effect of rapamycin (RAP) treatment on transformed phenotype expression, estimated by decreasing in percentage of the most brightened areas relative to the control (DMSO). * $p < 0.05$ in comparison with control

(в пикселях) наиболее ярких областей (с интенсивностью свечения 190–255), окрашенных у эмбрионов линии KRASV12 в красный и желтый псевдоцвета, которые отсутствовали у контрольных рыб tg(krt8:EGFP), была выбрана нами для количественной оценки степени трансформированности эпидермиса.

Тестирование соединений. Эмбрионы рыб в возрасте 6 ч были помещены в 6-луночные планшеты, содержащие тестируемые соединения, по 20 эмбрионов в каждую лунку. PAC (TEVA, Израиль) и RAP (LC Laboratories, США) использовали в концентрациях 1–2000 нмоль и 1–400 нмоль соответственно. Доза растворителя диметилсульфоксида (DMCO) составляла 0,1 % в экспериментальных и контрольной группах. Инкубацию проводили в термостате при температуре 28,5 °C до достижения эмбрионами возраста 72 ч.

Статистический анализ. При статистической обработке результатов опытов использовали методы вариационной статистики с помощью пакета статистических программ GraphPad Prism 6. Достоверность различий оценивали с применением теста Фишера LSD для one-way ANOVA.

Результаты

Морфология трансформированного фенотипа. Покровный эпителий трансгенных эмбрионов KRASV12 имел ряд морфологических признаков, свойственных трансформированной ткани. В частности, эпидермис личинок рыб в возрасте 48–72 ч характеризовался гиперпластическим многослойным ростом, потерей клетками способности к контактному торможению и пониженным уровнем тканевой адгезии. На клеточном уровне морфологические изменения приводили к уменьшению размеров клеток, приобретению ими округлой формы и усилению флуоресценции GFP-

репортера (рис. 1F). Указанные признаки никогда не встречались у контрольных рыб tg(krt8:EGFP), эпидермис которых состоял из полигональных клеток, расположенных в виде однослойного плоского эпителия с относительно равномерным уровнем экспрессии флуоресцентного репортера (рис. 1G).

Влияние RAP на формирование ТФ. Воздействие RAP приводило к дозозависимому снижению выраженности ТФ эпидермиса у эмбрионов KRASV12 (рис. 2). При этом дозы RAP в диапазоне от 1 до 25 нмоль не оказывали статистически значимого влияния на ТФ эмбрионов KRASV12. Дозы от 50 до 100 нмоль приводили к уменьшению признаков пренеопластической трансформации эпидермиса, о чем наряду с морфологическими изменениями свидетельствовало сокращение на 70–80 % доли красной и желтой областей на окрашенных псевдоцветами цифровых изображениях эмбрионов KRASV12 по сравнению с контрольной группой, обработанной DMCO. Применение более высоких (200–400 нмоль) доз RAP способствовало практически полной нормализации ТФ на тканевом и клеточном уровнях, усиливая морфологическое сходство эпидермиса KRASV12 и контрольных (несущих только трансген krt8:EGFP) эмбрионов. Вместе с тем следует отметить, что воздействие высоких доз RAP (200–400 нмоль) приводило к замедлению эмбрионального развития, что выражалось в сокращении длины тела и сохранении округлой формы желточного мешка (рис. 3A).

Влияние PAC на формирование ТФ. PAC в низких дозах (1–100 нмоль) не оказывал заметного влияния на выраженность морфологических изменений, обусловленных гиперэкспрессией трансгена *KRAS* в коже эмбрионов при 72-часовой экспозиции. Умеренные дозы PAC (100–500 нмоль) незначительно увеличивали выраженность признаков ТФ по сравнению с контролем, но, как правило, это увеличение не имело статистической значимости. Воздействие высоких доз PAC (>500 нмоль) способствовало значительному усилению гиперпластических процессов в эпидермисе, что выражалось в увеличении на 180–300 % доли красного и желтого псевдоцветов на цифровых изображениях эмбрионов KRASV12 (рис. 4). Следует отметить, что аппликация максимально переносимой дозы PAC, равной 1000 нмоль, примерно в трети случаев приводила к появлению аномальных эмбрионов, характеризующихся искривлением осевых структур (рис. 3B). Дозы PAC, равные или превышающие 2000 нмоль, были токсичны и вызывали гибель 100 % эмбрионов в течение 24–72 ч.

Влияние комбинации RAP и PAC на формирование ТФ. Совместное действие RAP и PAC в низких концентрациях (1–25 и 1–50 нмоль соответственно), не оказывавших по отдельности статистически значимого влияния на фенотип эмбрионов KRASV12 (рис. 3C–E), приводило к резкому уменьшению выраженности основных признаков трансформации эпидермальной

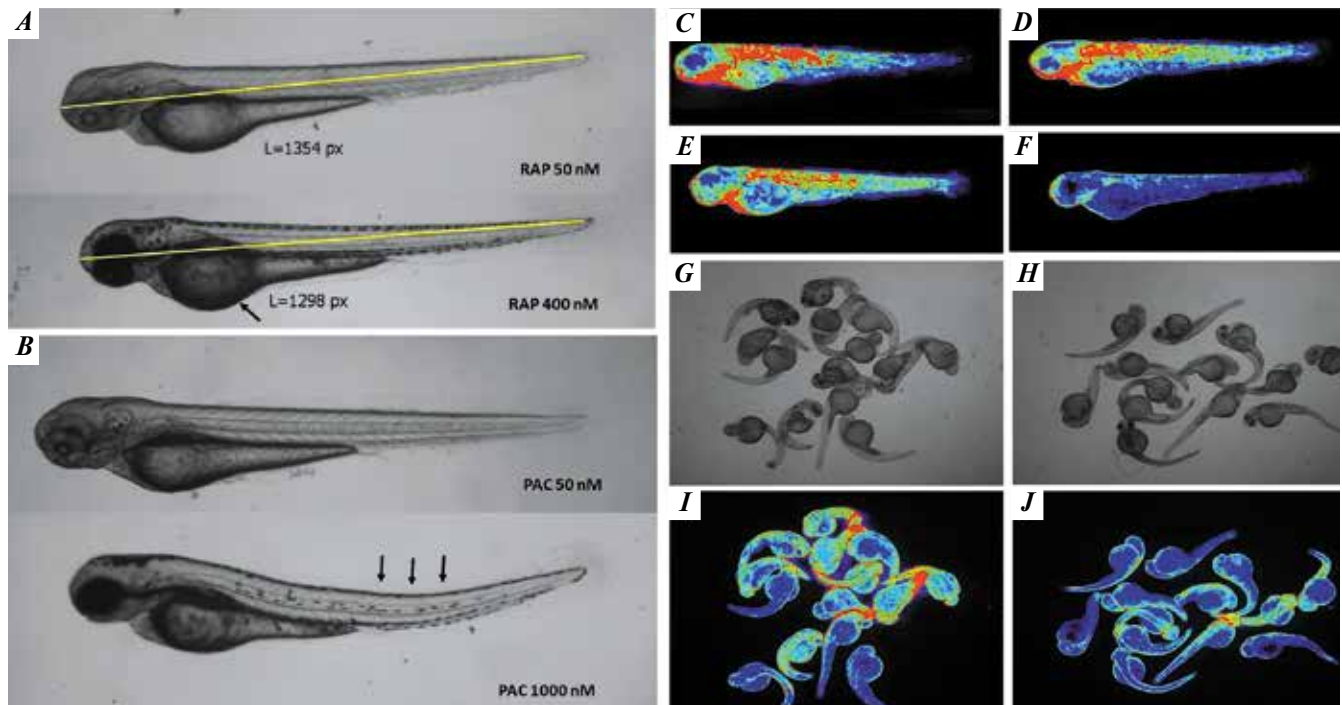


Рис. 3. Влияние паклитаксела (PAC), рапамицина (RAP) и их комбинации на эмбриональное развитие и выраженность трансформированного фенотипа (ТФ) у *KRASV12* зебрафиш. Морфология эмбрионов обработанных низкой (50 нмоль) и высокой (400 нмоль) дозами RAP (A). Наблюдались сокращение длины тела и отсутствие элонгации желточного мешка (указано стрелкой) эмбрионов, подвергнутых воздействию высокой концентрации ингибитора. Искривление осевых структур эмбрионов (указано стрелками) под влиянием высокой дозы PAC (1000 нмоль) (B). Растворитель ДМСО (C) и низкие дозы PAC (D) и RAP (E) не оказывали влияния на уровень экспрессии ТФ у *KRASV12* эмбрионов в отличие от их комбинации (F), полностью нормализующей структуру эпидермиса. PAC в дозе 2000 нмоль при индивидуальном применении (G, I) и в комбинации с RAP в дозе 50 нмоль (H, J) оказывал одинаковое токсическое действие на эмбрионы зебрафиш (G, H), но проявлял синергизм с RAP, нормализуя фенотип эмбрионов (I, J). Возраст эмбрионов на фотографиях равен 72 (A – F) и 48 (G – I) ч. Фотографии A, B, G, H получены при обычном освещении, а C – F, I, J – в свете флуоресценции и окрашены в псевдоцвета

Fig. 3. Effect of paclitaxel (PAC), rapamycin (RAP) and their combination on embryonic development and expression of transformed phenotype in *KRASV12* zebrafish. Morphology of embryos treated with low (50 nmol) and high (400 nmol) doses of RAP (A). Decreased body length and absence of yolk sac elongation (arrow) of embryos exposed to a high RAP dose were observed. Deformation of axial structures of embryos (arrows) under high dose of PAC (1000 nmol) was revealed (B). DMSO solvent (C) and low doses of PAC (D) and RAP (E) did not affect the level of transformed phenotype expression in *KRASV12* embryos, whereas their combination (F) completely normalized epidermal morphology. Despite the high toxicity of PAC (2000 nmol) causing embryo malformation (G, I), combination of it with low dose of RAP (50 nmol) displayed epidermal normalization (H, J). Embryos are aged 72 hpf (A – F) and 48 hpf (G – I). Pictures A, B, G, H – bright field microscopy; pictures C – F, I, J – fluorescence microscopy converted to pseudocolors

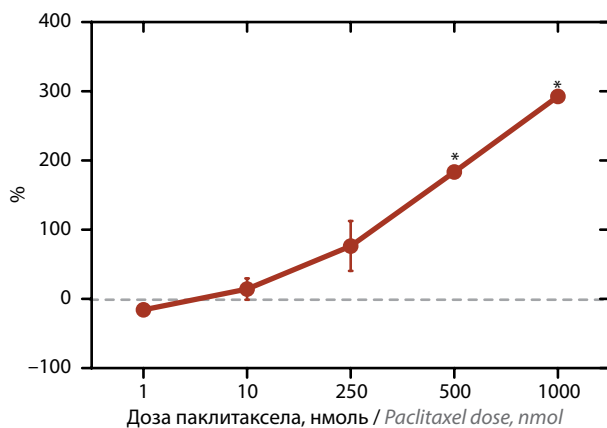


Рис. 4. Дозозависимое усиление выраженности трансформированного фенотипа под воздействием паклитаксела (PAC), оцениваемое по увеличению площади (в пикселях) наиболее ярких областей в процентах относительно контроля (ДМСО). *Различия с контролем статистически достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 4. Dose-dependent effect of paclitaxel (PAC) treatment on transformed phenotype expression, estimated by increasing in percentage of the most brightened areas relative to the control (DMSO). * $p < 0.05$ in comparison with control

ткани вплоть до полной ее нормализации (рис. 3F), начиная с комбинации доз, равных или превышающих 10 нмоль, для обоих препаратов (рис. 5). Увеличение дозы PAC до токсического уровня (2000 нмоль) не влияло на способность RAP (в дозе 50 нмоль) нормализовать трансгенный фенотип *KRASV12* у двухдневных эмбрионов (рис. 3I, J). При этом RAP не оказывал заметного тормозящего действия на формирование множественных летальных нарушений эмбрионального развития, обусловленных цитотоксической активностью PAC (рис. 3G, H).

Обсуждение

В результате проведенной работы получены данные о влиянии PAC и RAP на формирование ТФ в эпидермальной ткани новой трансгенной линии зебрафиш, способной к постоянной экспрессии онкогена *KRAS* в кератиноцитах. Следует отметить, что данная модель, обладая многими признаками, присущими опухолевому процессу (тканевая гиперплазия, снижение ад-

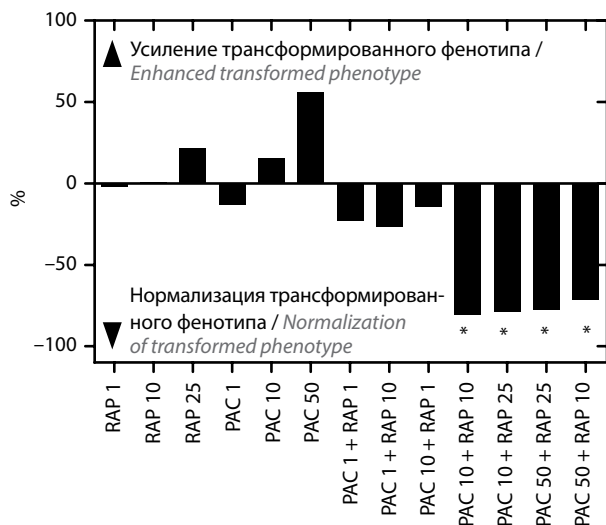


Рис. 5. Влияние монорежима и комбинаций рапамицина (RAP) и паклитаксела (PAC) на выраженность трансформированного фенотипа. По оси абсцисс: дозы препаратов, нмоль. По оси ординат: площадь (в пикселях) наиболее ярких областей в процентах относительно контроля ДМСО. *Различия с контролем ДМСО статистически достоверны ($p < 0,05$)

Fig. 5. Effect of rapamycin (RAP) and paclitaxel (PAC) on transformed phenotype expression. X-axis: drug doses, nmol. Y-axis: percentage of the most brightened areas relative to the control (DMSO). * $p < 0.05$ in comparison with control

гезивности, отсутствие контактного торможения), тем не менее, не приводит к развитию злокачественных новообразований кожи. Возможно, механизм этого феномена обусловлен непрерывным слущиванием трансформированных кератиноцитов во внешнюю среду из-за резкого ослабления межклеточных контактов. В этом случае опухоль просто не успевает сформироваться из-за быстрой элиминации потенциально онкогенных клеток. Это предположение косвенно подтверждается тем, что другие модели, основанные на экспрессии онкогена *KRAS* в тканях, которые ограничены внутренней средой организма рыб, способны приводить на определенном этапе к развитию типичных злокачественных опухолей различных локализаций [11, 12]. Тем не менее эти модели имеют ряд ограничений для практического использования, обусловленных длительным (несколько месяцев) латентным периодом и отсутствием синхронности развития новообразований. Единственным исключением, позволяющим иметь практически любое количество одновременно развивающихся опухолей, являются перевивные опухолевые штаммы, индуцированные с использованием сингенных клональных линий *D. rerio* [13]. Однако применение этого подхода требует более длительной (до 3 нед) экспозиции животных к тестируемым препаратам [14] по сравнению с моделями, основанными на редуцированном наборе признаков опухолевой трансформации, включая описанную в данной работе трансгенную линию. Поэтому, модели, основанные на нормализации ТФ, не имеют в настоящее время альтернативы в качестве тест-системы организменного уровня, предназначенной для предварительного

отбора новых комбинаций ингибиторов сигнального каскада онкогена *KRAS*.

Как и ожидалось, RAP – известный ингибитор mTOR – оказывал дозозависимый эффект на выраженность признаков опухолеподобной трансформации в эпидермисе трансгенных рыб линии KRASV12 вплоть до полной фенотипической нормализации тканевой структуры. При этом достоверные отличия от контрольной группы KRASV12, подвергнутой воздействию растворителя (ДМСО), начинались уже с дозы, равной 50 нмоль, а доза RAP, равная 400 нмоль, способствовала полной нормализации фенотипа трансгенных рыб. Вместе с тем высокие дозы RAP приводили к уменьшению размеров тела эмбрионов и задержке их развития (см. рис. 3А). Из серьезных нарушений, вызванных действием RAP в максимальной дозе 400 нмоль, следует отметить аномалию формирования желудочно-кишечного тракта, что согласуется с данными литературы [15].

Следует отметить, что и на других трансгенных моделях, связанных с гиперэкспрессией генов семейства RAS и характеризующихся развитием гиперплазии тканей у эмбрионов рыб, действие различных ингибиторов сигнальных каскадов MEK/ERK и PI3K/AKT также приводило к нормализации измененного фенотипа. В частности, снижение скорости пролиферации гепатоцитов под влиянием ингибиторов каскадов MEK/ERK и PI3K/AKT отмечено на мифепристониндуцибельной модели LexPR опухолей печени зебрафиш, основанной на активации генной конструкции, содержащей онкоген *KRASV12*. При этом установлено, что для полного подавления процесса пролиферации гепатоцитов необходимо ингибирование обеих ветвей сигнального каскада, являющегося эффектором онкогена *KRAS* [16]. Похожие результаты получены и на трансгенной модели меланомы зебрафиш tg(mitfa:V12HRAS;mitfa:GFP), развитие которой обусловлено гиперэкспрессией мутантной формы гена *HRAS* в меланоцитах. В этом случае ингибирование каскадов MEK/ERK и PI3K/AKT приводило к торможению гиперплазии меланоцитов и снижению скорости роста опухолей [17].

В отличие от RAP, химиотерапевтический препарат таксанового ряда PAC оказывал противоположное действие на выраженность ТФ у эмбрионов линии KRASV12, начиная с дозы 500 нмоль. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные о воздействии этого цитостатика на зебрафиш указывают на то, что помимо нейротоксического эффекта PAC оказывает повреждающее действие на клетки эпидермиса личинок и уменьшает резистентность их кожи к механическому стрессу [18]. В наших экспериментах нарушения формирования осевых структур были выявлены у 30 % животных, подвергнутых действию PAC в дозе 1000 нмоль. Увеличение дозы PAC до 2000 нмоль приводило к аномальному развитию 100 % обработанных эмбрионов через 48 ч и их гибели в возрасте 72 ч.

Мы предполагаем, что проявление токсического действия PAC на эмбрионы обусловлено его способностью блокировать клеточную пролиферацию на границе стадий митотического цикла G2 – M, что является основным механизмом его действия как цитостатического агента.

С другой стороны, совместное применение низких доз PAC (10 и 50 нмоль) и RAP (10 и 25 нмоль), которые при индивидуальном использовании не оказывали выраженного эффекта на измененный эпидермис эмбрионов линии KRASV12, приводило к полной нормализации ТФ. Эти результаты, полученные нами на модели *in vivo*, хорошо согласуются с многочисленными данными литературы, где было показано, что сочетание PAC и RAP (или его аналогов) обладает синергическим действием на опухолевые линии, снижая скорость пролиферации клеток в условиях *in vitro*. Так, применение комбинации RAP и PAC ингибировало рост клеток линий рака молочной железы MCF-7 и MDAMB-468, при этом клеточные линии, которые были изначально резистентны к ингибирующему действию RAP, оказались также не чувствительны к совместному действию RAP с химиотерапевтическими препаратами [5]. Ингибиторы mTOR (RAP и RAD001) тормозили пролиферацию клеток рака эндометрия Ishikawa, ECC-1 и HEC-1A человека и повышали их чувствительность к апоптозу, индуцированному PAC [19]. Использование комбинации PAC и ингибиторов сигнального каскада PI3K/АКТ (RAP и BEZ235) более эффективно тормозило рост клеток рака толстой кишки HCT-116 и HT-29, чем каждый из препаратов в отдельности [20]. В ряде клинических испытаний также показан синергический ингибирующий эффект рапалогов и PAC на рост солидных опухолей, рака эндометрия и молочной железы [21, 22].

В целом наши наблюдения свидетельствуют о том, что усиление выраженности ТФ у эмбрионов линии KRASV12 при индивидуальном использовании PAC или, наоборот, нормализация структуры покровного

эпителия рыб при его сочетании с RAP, обусловлено способностью PAC, помимо цитотоксического действия, связанного с блокированием митотического цикла, прямо или опосредованно взаимодействовать с определенными компонентами сигнального каскада онкогена KRAS. При этом представляется вероятным, что клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе отмеченных эффектов, практически не связаны между собой. Подтверждением этого вывода может служить обнаруженный нами феномен нормализации фенотипа эмбрионов линии KRASV12, подвергнутых сочетанному воздействию летальной дозы PAC (2000 нмоль) и не оказывающей влияния на ТФ концентрации RAP (50 нмоль) в течение 48 ч. При этом токсический эффект цитостатика, оцениваемый по числу аномальных эмбрионов, оставался неизменным и соответствовал уровню контрольной группы, обработанной только высокой дозой PAC (см. рис. 3G–J). Интересно отметить, что сочетание более низких доз PAC (10 и 50 нмоль) и RAP (10 и 25 нмоль) приводило к замедлению формирования эмбрионов, что характерно для высоких доз (200 и 400 нмоль) RAP, а не усиливало токсическое действие PAC, что, как можно предположить, выразалось бы в увеличении числа рыб с серьезными аномалиями развития.

Заключение

В силу высокой консервативности механизмов канцерогенеза у рыб и млекопитающих трансляционная составляющая результатов экспериментов на зебрафиш обладает предиктивным потенциалом, сопоставимым с традиционными онкологическими моделями с использованием грызунов. Поэтому дальнейшее изучение комбинированного применения низких доз (существенно меньше максимально переносимых) PAC и ингибиторов mTOR может стать основой для создания клинического протокола таргетной терапии RAS-ассоциированных опухолей, в том числе резистентных к цитотоксическому действию PAC.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bos J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682–9. PMID: 2547513.
2. Easton J.B., Houghton P.J. mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 2006;25(48):6436–46. DOI: 10.1038/sj.onc.1209886. PMID: 17041628.
3. Conciatori F., Ciuffreda L., Bazzichetto C. et al. mTOR cross-talk in cancer and potential for combination therapy. *Cancers (Basel)* 2018;10(1):E23. DOI: 10.3390/cancers10010023. PMID: 29351204.
4. Blagosklonny M.V. Rapalogs in cancer prevention: anti-aging or anticancer? *Cancer Biol Ther* 2012;13(14):1349–54. DOI: 10.4161/cbt.22859. PMID: 23151465.
5. Mondesire W.H., Jian W., Zhang H. et al. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):7031–42. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0361. PMID: 15501983.
6. Shafer A., Zhou C., Gehrig P.A. et al. Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Int J Cancer* 2010;126(5):1144–54. DOI: 10.1002/ijc.24837. PMID: 19688827.
7. Okano J., Rustgi A.K. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *J Biol Chem* 2001;276(22):19555–64. DOI: 10.1074/jbc.M011164200. PMID: 11278851.
8. Mabuchi S., Ohmichi M., Kimura A. et al. Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* 2002;277(36):33490–500. DOI: 10.1074/jbc.M204042200. PMID: 12087097.
9. Amatruda J.F., Patton E.E. Genetic models of cancer in zebrafish. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008;271:1–34. DOI: 10.1016/S1937-6448(08)01201-X. PMID: 19081540.

10. Gong Z., Ju B., Wang X. et al. Green fluorescent protein expression in germ-line transmitted transgenic zebrafish under a stratified epithelial promoter from keratin 8. *Dev Dyn* 2002;223(2):204–15. DOI: 10.1002/dvdy.10051. PMID: 11836785.
11. Liu S., Leach S.D. Zebrafish models for cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:71–93. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130330. PMID: 21261518.
12. Astone M., Dankert E.N., Alam S.K., Hoepfner L.H. Fishing for cures: the aLURE of using zebrafish to develop precision oncology therapies. *NPJ precision oncology* 2017;1:39. DOI: 10.1038/s41698-017-0043-9. PMID: 29376139.
13. Mizgirev I.V., Revskoy S.Y. Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafish. *Cancer Res* 2006;66(6):3120–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3800. PMID: 16540662.
14. Mizgirev I.V., Revskoy S. A new zebrafish model for experimental leukemia therapy. *Cancer Biol Ther* 2010;9(11):895–902. PMID: 20339318.
15. Kuscic C. Effect of rapamycin on early development of Zebrafish (*Danio rerio*). A thesis submitted to the Department of Molecular Biology and Genetics of Bilkent University, 2004. 77 p.
16. Nguyen A.T., Emelyanov A., Koh C.H. et al. An inducible KRASV12 transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening. *Dis Model Mech* 2012;5(1):63–72. DOI: 10.1242/dmm.008367. PMID: 21903676.
17. Fernandez Del Ama L., Jones M., Walker P. et al. Reprofling using a zebrafish melanoma model reveals drugs cooperating with targeted therapeutics. *Oncotarget* 2016;7(26):40348–61. DOI: 10.18632/oncotarget.9613. PMID: 27248171.
18. Lisse T.S., Middleton L.J., Pellegrini A.D. et al. Paclitaxel-induced epithelial damage and ectopic MMP-13 expression promotes neurotoxicity in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(15):E2189–98. DOI: 10.1073/pnas.1525096113. PMID: 27035978.
19. Wang H., Li D., Li X. et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 sensitizes endometrial cancer cells to paclitaxel-induced apoptosis via the induction of autophagy. *Oncol Lett* 2016;12(6):5029–35. DOI: 10.3892/ol.2016.5338. PMID: 28105210.
20. Zou H., Li L., Garcia Carcedo I. et al. Synergistic inhibition of colon cancer cell growth with nanoemulsion-loaded paclitaxel and PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 through apoptosis. *Int J Nanomedicine* 2016;11:1947–58. DOI: 10.2147/IJN.S100744. PMID: 27226714.
21. Campone M., Levy V., Bourbouloux E. et al. Safety and pharmacokinetics of paclitaxel and the oral mTOR inhibitor everolimus in advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2009;100(2):315–21. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604851. PMID: 19127256.
22. Hurvitz S.A., Dalenc F., Campone M. et al. A Phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2013;141:437–46. DOI: 10.1007/s10549-013-2689-5. PMID: 24101324.

Вклад авторов

М.Н. Юрова: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Д.Р. Сафина: анализ полученных данных, подготовка иллюстраций, написание текста рукописи;
 И.В. Мизгирев: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, написание текста рукописи.

Authors' contributions

M.N. Yurova: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
 D.R. Safina: analysis of the obtained data, preparation of illustrations, article writing;
 I.V. Mizgirev: developing the research design, obtaining data for analysis, article writing.

ORCID авторов

М.Н. Юрова: <https://orcid.org/0000-0003-3589-5871>

ORCID of authors

M.N. Yurova: <https://orcid.org/0000-0003-3589-5871>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-10112).
Financing. The study was performed with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 17-75-10112).

Протокол исследования одобрен Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (выписка № 3/168 из протокола очередного заседания № 17 от 22.09.2017).

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (extract No. 3/168 from the protocol of a regular session No. 17 from 22.09.2017).

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 13.02.2018. **Принята к публикации:** 24.05.2018

Article received: 13.02.2018. **Accepted for publication:** 24.05.2018

Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска

М.В. Кручинина^{1,2}, В.Н. Кручинин³, Я.И. Прудникова¹, А.А. Громов¹, М.В. Шашков⁴, А.С. Соколова⁵

¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; Россия, 630089 Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52;

³ФГБНУ «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 13;

⁴ФГБНУ «Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 5;

⁵ФГБНУ «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 9

Контакты: Маргарита Витальевна Кручинина kruchmargo@yandex.ru

Цель исследования – изучить уровень жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком.

Материалы и методы. В основную группу вошли 100 пациентов с диагностированным колоректальным раком (57 мужчин и 43 женщины). Контрольная группа включала 24 практически здоровых человека (14 мужчин и 10 женщин), не имеющих злокачественных новообразований, без манифестирующей патологии внутренних органов. Группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Результаты. Выявлены сниженные уровни насыщенных, мононенасыщенных жирных кислот и повышенные – полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в мембранах эритроцитов и сыворотке крови ($p < 0,0001–0,05$). Уровни омега-3 ПНЖК при колоректальном раке превышали таковые у здоровых лиц как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови, для омега-6 ПНЖК выявлена лишь тенденция к повышению. При этом соотношение омега-6/омега-3 ПНЖК при колоректальном раке ниже, чем в контроле ($p < 0,0001–0,002$). Состояние мембран эритроцитов более достоверно и по большему числу показателей, чем сыворотка крови, отражает имеющиеся различия между группами. Наиболее дискриминирующими показателями между пациентами с колоректальным раком и здоровыми лицами как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови, оказались уровни C20:2;11,14 (докодиеновой), C20:3;8,11,14 (дигомо-γ-линоленовой), C20:4;5,8,11,14 (эйкозатетраеновой, арахидоеновой), C22:5;7,10,13,16,19 (докозапентаеновой) и C22:6;4,7,10,13,16,19 (докозагексаеновой) ПНЖК.

Ключевые слова: жирные кислоты мембран, полиненасыщенные жирные кислоты, сыворотка крови, эритроциты, колоректальный рак

Для цитирования: Кручинина М.В., Кручинин В.Н., Прудникова Я.И. и др. Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(2):50–61.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-50-61

Study of the level of fatty acids in erythrocyte membranes and serum of patients with colorectal cancer in Novosibirsk

M.V. Kruchinina^{1,2}, V.N. Kruchinin³, Ya.I. Prudnikova¹, A.A. Gromov¹, M.V. Shashkov⁴, A.S. Sokolova⁵

¹Research Institute of Therapy and Preventive Medicine – a branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1 B. Bogatkova St., Novosibirsk 630089, Russia;

²Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 52 Krasniy Prospekt, Novosibirsk 630091, Russia;

³A.V. Rzhanov Institute of Semiconductor Physics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 12 Acad. Lavrentieva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

⁴G.K. Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 5 Acad. Lavrent'eva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia;

⁵N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry; 9 Acad. Lavrent'eva Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

The objective is to measure the level of fatty acids in erythrocyte membranes and serum of patients with colorectal cancer.

Materials and methods. The study group included 100 patients with diagnosed colorectal cancer (57 men and 43 women). The control group included 24 reasonably healthy people (14 men and 10 women) matched for age and sex, without malignant cancers or manifested pathology of the internal organs.

Results. Decreased levels of saturated, monounsaturated fatty acids and increased levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in erythrocyte membranes and serum ($p < 0.0001-0.05$) were observed. The levels of omega-3 PUFAs in colorectal cancer exceeded the levels in healthy individuals both in erythrocyte membranes and in serum; for omega-6 PUFAs only a trend was observed. At the same time, the ratio of omega-6/omega-3 PUFAs in colorectal cancer was lower than in control ($p < 0.0001-0.002$). The state of erythrocyte membranes more significantly and for more parameters characterized differences between the groups than serum. The most discriminating parameters between patients with colorectal cancer and healthy individuals both in erythrocyte membranes and serum were the levels of C20:2;11,14 (eicosadienoic), C20:3;8,11,14 (dihomo- γ -linolenic), C20:4;5,8,11,14 (eicosatetraenoic, arachidonic), C22:5;7,10,13,16,19 (docosapentaenoic), and C22:6;4,7,10,13,16,19 (docosahexaenoic) PUFAs.

Key words: membrane fatty acids, polyunsaturated fatty acids, serum, erythrocytes, colorectal cancer

For citation: Kruchinina M.V., Kruchinin V.N., Prudnikova Ya.I. et al. Study of the level of fatty acids in erythrocyte membranes and serum of patients with colorectal cancer in Novosibirsk. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(2):50–61.

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований во всем мире, и его патогенез, как установлено, связан с особенностями диеты, а именно с потреблением пищевых жирных кислот (ЖК). В литературе имеются многочисленные сведения о влиянии различных пищевых ЖК на риск появления, пролиферацию и апоптоз клеток КРР человека [1–3]. Тем не менее к настоящему времени недостаточно ясна роль как мононенасыщенных ЖК, так и полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) в механизме возникновения и развития этого заболевания. Состав ЖК сывороточных липидов считается надежным показателем, отражающим потребление ЖК в течение нескольких недель или месяцев [4, 5]. Изменения состава ЖК в эритроцитах происходят в более отдаленные сроки, чем в сыворотке крови [6]. Несмотря на то, что в литературе имеются сведения о связи заболеваемости КРР с составом, а также с уровнем ЖК в сыворотке и мембранах эритроцитов, неясно, возможно ли использование отдельных видов ЖК как биомаркеров в диагностике ранних стадий КРР и оценке прогрессирования заболевания: определения как наличия метастазов, так и их преимущественной локализации [7–11]. Другой важный аспект изучения состава и роли отдельных ЖК может быть связан с их перспективным использованием в таргетной терапии КРР [1, 7–9]. Представлены данные об особенностях состава и уровня ЖК сыворотки и эритроцитов у пациентов с КРР, проживающих в Японии [12, 13], Китае [2, 14, 15], странах Западной Европы [1, 7, 8]. Эти особенности связывают с диетическими традициями, отличиями в образе жизни. Подобная информация о пациентах с КРР, проживающих в Сибири, отсутствует.

Цель исследования — изучить уровень ЖК мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с КРР г. Новосибирска для оценки возможности их использования при диагностике патологии, определении их возможной роли в патогенезе заболевания.

Материалы и методы

Больные, поступившие в Новосибирский областной онкологический диспансер с гистологически

подтвержденным КРР (аденокарцинома), были включены в исследование при отсутствии потери массы тела (по данным самоотчета), диетических ограничений из-за непроходимости кишечника, серьезного сопутствующего заболевания (сахарного диабета, выраженной печеночной или почечной недостаточности, гиперлипидемии, требующих лечения препаратами), других злокачественных новообразований в анамнезе. В основную группу вошли 100 пациентов с КРР (57 мужчин и 43 женщины). Средний возраст составил $63,2 \pm 9,38$ года.

Контрольная группа включала 24 практически здоровых человека (14 мужчин и 10 женщин), не имеющих злокачественных новообразований, без манифестирующей патологии внутренних органов. Средний возраст составил $61,7 \pm 7,52$ года. Группы были сопоставимы по возрасту и полу.

КРР диагностирован в соответствии с комбинированными клиническими критериями, включая данные визуализации, маркеры опухоли в сыворотке крови и кале с дополнительным подтверждением диагноза гистопатологическим анализом. У всех пациентов опухоль толстой кишки диагностирована впервые. У большинства выявлена умеренно-дифференцированная аденокарцинома, высокой ($n = 6$) и низкой ($n = 3$) степени дифференцировки.

Стадию КРР уточняли после операции с исследованием патологического образца и с учетом наличия метастазирования в регионарные лимфатические узлы или обнаружения отдаленных метастазов в соответствии с классификацией TNM (7-я редакция, 2009). У 45 пациентов выявлены ранние стадии заболевания: у 7 — I, у 38 — II. У 37 больных диагностирована III стадия КРР, у 18 — IV. Пациенты с IV стадией имели различную локализацию метастазов: отдаленные единичные в печень ($n = 12$), множественные в печень и легкие ($n = 4$), в печень и брюшину ($n = 2$).

Выявленные опухоли локализовались в различных отделах толстой кишки: в проксимальной части кишки (в слепой кишке ($n = 8$), восходящем ($n = 8$) и поперечно-ободочном ($n = 7$) отделах толстой кишки), в дистальной ободочной кишке (нисходящей ($n = 2$) и сигмовидной ($n = 27$)), в прямой кишке ($n = 47$).

У 1 пациента диагностирована первично-множественная локализация опухолей в толстой кишке.

Пациентов контрольной группы исключали из исследования в случае, если они получали какие-либо добавки омега-3 ПНЖК или статины, имели гиперлипидемию, требующую лекарственной коррекции, какие-либо значительные отклонения по данным общего или биохимического анализа крови или холестерина в желчном пузыре, поскольку эти факторы оказывают существенное влияние на профиль ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов [4].

Вышеперечисленные критерии включения/исключения связаны со значимым их влиянием на уровень и соотношение ЖК. На 1-м этапе пилотного исследования предполагался анализ изменений ЖК-состава, ассоциированных именно с наличием КРР. Продолжение исследования предусматривало расширение критериев включения с проведением многофакторного анализа и оценкой влияния нарушений липидного обмена и иных факторов, значимых для развития КРР, на уровень ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови.

Исследование одобрено комитетом биомедицинской этики Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины (29.11.2016; протокол № 123).

Сбор образцов крови и пробоподготовка. Забор крови у пациентов и ее исследование выполняли при поступлении в стационар до проведения всех видов терапии после ночного голодания (12–14 ч). Далее кровь использовали для получения сыворотки и взвеси эритроцитов.

Для получения сыворотки 8–9 мл крови центрифугировали (2000 об/мин, 20 мин) и готовую сыворотку переносили в пробирки меньшего объема.

Для получения взвеси эритроцитов 8–9 мл крови смешивали с 3,8 % раствором цитрата натрия (0,129 моль/л, соотношение 1:9), центрифугировали (2000 об/мин, 20 мин) и удаляли плазму. Полученные эритроциты отмывали фосфатным буфером (0,103М Na₂HPO₄; 0,155М KH₂PO₄; pH 7,36) с трехкратным центрифугированием при температуре 2–3 °С (2000 об/мин, 20 мин). Мембраны эритроцитов получали путем гемолиза клеток дистиллированной водой (0,5 мл взвеси и 1,5 мл дистиллированной воды), все тщательно встряхивали и центрифугировали дважды (10000 об/мин, 15 мин).

Процедура экстракции и переэтерификации. Для анализа мембран эритроцитов и сыворотки использовали экстракцию 1 мл смеси хлороформ/метанол (2/1) [16]. Пробу суспендировали в 0,5 мл смеси, добавляли 0,5 мл фосфатного буфера, после чего интенсивно встряхивали в течение нескольких минут. Органическую фазу переносили в чистую vortex-пробирку. Водная фаза повторно экстрагировалась 0,5 мл смеси. Порции объединяли. Растворитель удаляли досуха путем отдувки сухим аргоном. Для переэтерификации добавляли 0,5 мл 0,5М КОН в метаноле. Смесь периодически

встряхивали (при комнатной температуре, 1 ч). После окончания реакции проводили двукратную экстракцию полученных эфиров n-гексаном по 0,5 мл. Экстракт переносили в стеклянные виалы и отдували сухим азотом до объема 50 мкл. Полученные образцы использовали для анализа ЖК.

Анализ метиловых эфиров. Анализ образцов, содержащих метиловые эфиры ЖК, проводили на хромато-масс-спектрометре Agilent 7000В (США) с анализатором на основе тройного квадруполя и источником электронной ионизации (70 эВ). Анализ продуктов реакции осуществляли на разработанной в аналитической лаборатории Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН высокополярной хроматографической колонке на основе ионной жидкости 4PrMPy 25 м × 0,22 мм × 0,2 мкм по оригинальной методике [16]. Предел обнаружения ЖК составлял ~1 мкг на образец, концентрации ЖК выражали в относительных процентах [17].

Определены уровни следующих омега-3 (n-3) ПНЖК: С18:3n-3 (α-линоленовая), С20:5n-3 (эйкозапентаеновая, EPA), С22:5n-3 (докозапентаеновая) и С22:6n-3 (докозагексаеновая, DHA). В перечень установленных омега-6 (n-6) ПНЖК вошли: С18:2n-6 (линолевая), С20:2n-6 (докодиеновая), С20:3n-6 (дигомо-γ-линоленовая), С20:4n-6 (арахидоновая) и С22:4n-6 (докозатетраеновая).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы SPSS 17.0. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (нормальный закон распределения) либо по U-критерию Манна–Уитни, Колмогорова–Смирнова (отклонения от нормального закона). Категориальные данные анализировали с помощью критерия χ² Пирсона. В связи с небольшим объемом выборки для выявления достоверности различий между группами использовали U-критерий Манна–Уитни с коррекцией методом поправки Бонферрони. Для оценки ассоциации между статусом КРР и контролем использована логистическая регрессия; учтено одно стандартное отклонение изменения уровня каждой ЖК как нескорректированное, так и скорректированное по полу, возрасту и индексу массы тела. Из-за ограниченного числа наблюдений оценены отдельные модели для каждой из скорректированных переменных. В отношении шансов для ЖК 10 % изменение (сравнение скорректированного значения с нескорректированным) считалось свидетельством изменения. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимали равным 0,05. Для дифференцирования состава ЖК в сыворотке крови и мембранах эритроцитов между лицами контрольной и основной групп использовали метод главных компонент с применением программы Statistica 10.0.228.8.

Результаты

Клинические проявления КРР у пациентов основной группы отсутствовали или проявлялись

неспецифическими симптомами – кровь в кале (23 %), изменение характера стула (34 %), боли в животе (41 %), потеря массы тела (42 %), изменение аппетита (39 %), слабость (49 %). Сопутствующую патологию со стороны сердечно-сосудистой системы имели 55 % больных, со стороны органов пищеварения – 56 %, половой системы – 20 %, эндокринной системы – 16 %, мочевыделительной системы – 15 %. Исследование биохимических показателей не выявило выраженных метаболических нарушений (уровни глюкозы крови $5,66 \pm 0,83$ ммоль/л, общего белка $65,8 \pm 0,94$ г/л, альбумина $35,7 \pm 0,54$ г/л, активности аланинаминотрансферазы $19,65 \pm 0,97$ U/l, аспартатаминотрансферазы $24,8 \pm 0,82$ U/l, гамма-глутамилтранспептидазы $36,24 \pm 3,22$ U/l, щелочной фосфатазы $178,86 \pm 4,53$ U/l, общего билирубина $12,18 \pm 0,55$ мкмоль/л, прямого билирубина $5,54 \pm 0,35$ мкмоль/л, мочевой кислоты $380,4 \pm 18,0$ мг/дл, креатинина $75,98 \pm 2,06$ мкмоль/л, мочевины $5,46 \pm 0,12$ ммоль/л).

С учетом имеющихся данных о влиянии на состав ЖК возраста, пола, приема алкоголя, курения и индекса массы тела [4, 12, 18, 19] при обследовании пациентов проанализирована информация о стиле употребления алкоголя и курении (курение и употребление алкоголя представлены как статусы: текущий (Т), прежний (П) и отсутствие (О)), рассчитан индекс массы тела, представлены показатели липидного профиля сыворотки крови. Клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Пациенты обследуемых групп сопоставимы по возрасту, полу, достоверно не различались по индексу массы тела. Среди больных КРР отмечена тенденция к преобладанию лиц с прежним интенсивным употреблением алкоголя (до нескольких раз в неделю) и текущим курением (более одной пачки в день) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Также в основной группе достоверно меньше тех, кто не курил и не употреблял алкоголь вообще ($p < 0,01-0,05$). По данным липидного профиля сыворотки крови достоверных различий по уровням общего холестерина и триглицеридов не выявлено, но уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) оказался выше, а холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) – достоверно ниже в основной группе ($p < 0,05$).

В основной группе уровень **насыщенных ЖК** в мембранах эритроцитов оказался достоверно ниже ($p < 0,0001$), с той же тенденцией в сыворотке крови ($p = 0,059$), по сравнению с контрольной группой (табл. 2, 3). Содержание насыщенных ЖК оказалось выше в мембранах эритроцитов по сравнению с сывороткой крови, кроме арахидиновой (эйкозановой С20:0) кислоты, высокий уровень которой выявлен в сыворотке крови в обеих группах.

Наиболее выраженные различия между пациентами основной и контрольной групп выявлены по уровням следующих насыщенных ЖК в мембранах эритроцитов: лауриновой (С12:0), миристиновой (С14:0),

Таблица 1. Клинико-биохимические показатели в обследованных группах ($M \pm m$)

Table 1. Clinical and biochemical characteristics in the examined groups ($M \pm m$)

Характеристика Characteristic	Основная группа ($n = 100$) Study group ($n = 100$)	Контрольная группа ($n = 24$) Control group ($n = 24$)
Возраст, лет Age, years	$63,20 \pm 9,38$	$61,70 \pm 7,52$
Курение Т/П/О, % Smoking C/P/N, %	30*/22/48**	4,2/16,7/79,1
Употребление алкоголя Т/П/О, % Alcohol consumption C/P/N, %	31/29/40*	25,0/20,8/54,2
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	$24,8 \pm 3,6$	$25,3 \pm 3,2$
Уровень общего холестерина, ммоль/л Total cholesterol level, mmol/l	$4,36 \pm 1,57$	$4,51 \pm 1,24$
Уровень ХС ЛПВП, ммоль/л HDL ChS level, mmol/l	$1,01 \pm 0,60^*$	$1,38 \pm 0,70$
Уровень ХС ЛПНП, ммоль/л LDL ChS level, mmol/l	$2,88 \pm 0,63^*$	$2,47 \pm 0,52$
Уровень триглицеридов, ммоль/л Triglyceride level, mmol/l	$1,42 \pm 0,64$	$1,12 \pm 0,55$

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

Примечание. Т/П/О – статус курения и употребления алкоголя: Т – текущий, П – прежний, О – отсутствие; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности.

Note. C/P/N – status of smoking and alcohol consumption: C – currently, P – previously, N – never; HDL ChS – high-density lipoprotein cholesterol; LDL Chs – low-density lipoprotein cholesterol.

пентадекановой (С15:0), пальмитиновой (С16:0), маргаритиновой (С17:0) ($p = 0,001-0,048$). Они оказались ниже при КРР по сравнению с контрольной группой. Вместе с тем стеариновая ЖК (С18:0) обнаружила тенденцию к повышению в мембранах эритроцитов и сыворотке крови у пациентов с КРР, а арахидиновая (эйкозановая 20:0) с высокой степенью достоверности ($p < 0,0001$) преобладала в мембранах эритроцитов больных КРР, не различаясь по уровню в сыворотке крови.

Содержание **ненасыщенных ЖК** оказалось достоверно выше в мембранах эритроцитов больных КРР ($p < 0,0001$) с той же тенденцией для сыворотки крови

Таблица 2. Содержание жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови у пациентов основной и контрольной групп ($M \pm SD$), %Table 2. Fatty acid levels in erythrocyte membranes and serum in patients of the study and control groups ($M \pm SD$), %

Жирные кислоты Fatty acids	Мембраны эритроцитов Erythrocyte membranes			Сыворотка крови Serum		
	Основная группа (n = 100) Study group (n = 100)	Контрольная группа (n = 24) Control group (n = 24)	p	Основная группа (n = 100) Study group (n = 100)	Контрольная группа (n = 24) Control group (n = 24)	p
C12:0 додекановая (лауриновая) C12:0 dodecanoic (lauric)	0,90 ± 0,65	1,19 ± 0,65	0,048	0,51 ± 0,44	0,58 ± 0,42	0,267
C14:0 тетрадекановая (миристиновая) C14:0 tetradecanoic (myristic)	1,0 ± 0,65	1,55 ± 0,96	0,015	1,01 ± 0,57	4,07 ± 7,05	0,047
C15:0 пентадекановая C15:0 pentadecanoic	0,42 ± 0,29	0,64 ± 0,45	0,029	0,30 ± 0,14	0,34 ± 0,21	0,237
C16:0 гексадекановая (пальмитиновая) C16:0 hexadecanoic (palmitic)	26,37 ± 5,15	29,94 ± 3,57	0,001	23,83 ± 3,87	24,15 ± 5,09	0,404
C16:1;7 цис-7-гексадекановая (7-пальмитолеиновая) C16:1;7 cis-7-hexadecanoic (7-palmitoleic)	0,90 ± 0,66	1,47 ± 1,25	0,038	0,59 ± 0,33	0,58 ± 0,37	0,458
C16:1;9 цис-9-гексадекановая (пальмитолеиновая) C16:1;9 cis-9-hexadecanoic (7-palmitoleic)	1,66 ± 0,84	2,49 ± 1,39	0,012	1,59 ± 0,66	1,34 ± 0,63	0,079
C17:0 гептадекановая (маргариновая) C17:0 heptadecanoic (margaric)	0,30 ± 0,14	0,38 ± 0,12	0,009	0,23 ± 0,10	0,22 ± 0,13	0,463
C16:2;9,12 гексадекадиеновая C16:2;9,12 hexadecadienoic	0,18 ± 0,17	0,13 ± 0,14	0,124	0,10 ± 0,11	0,11 ± 0,08	0,318
C18:0 октадекановая (стеариновая) C18:0 octadecanoic (stearic)	14,08 ± 1,92	13,59 ± 1,56	0,125	6,06 ± 1,78	5,86 ± 1,17	0,280
C18:1;9 цис-9-октадекановая (олеиновая) C18:1;9 cis-9-octadecanoic (oleic)	14,79 ± 2,30	15,29 ± 1,85	0,165	19,84 ± 3,41	19,88 ± 4,25	0,487
C18:1;t9 транс-9-октадекановая (элаидиновая) C18:1;t9 trans-9-octadecanoic (elaidic)	1,10 ± 0,64	1,41 ± 0,50	0,014	1,32 ± 0,49	1,27 ± 0,49	0,348
C18:2;9,12 октадекадиеновая (линолевая) C18:2;9,12 octadecanoic (linoleic)	12,63 ± 2,81	14,08 ± 2,39	0,015	33,68 ± 5,24	35,27 ± 9,46	0,255
C20:0 (эйкозановая, арахидоновая) C20:0 (eicosanoic, arachidonic)	0,13 ± 0,15	0,06 ± 0,04	0,0001	0,15 ± 0,09	0,15 ± 0,08	0,490
C18:3;6,9,12 октадекатриеновая (α-линоленовая) C18:3;6,9,12 octadecatrenoic (α-linolenic)	0,31 ± 0,30	0,18 ± 0,19	0,014	0,48 ± 0,47	0,39 ± 0,25	0,125
C20:2;11,14 (докодиеновая) C20:2;11,14 (docosadienoic)	0,35 ± 0,23	0,19 ± 0,10	0,0001	0,19 ± 0,13	0,11 ± 0,07	0,0001
C20:3;8,11,14 (дигомо-γ-линоленовая) C20:3;8,11,14 (dihomo-γ-linolenic)	1,32 ± 0,54	0,95 ± 0,28	0,0001	0,86 ± 0,35	0,59 ± 0,22	0,0001
C20:4;5,8,11,14 (эйкозатетраеновая) арахидоновая C20:4;5,8,11,14 (eicosatetraenoic) arachidonic	14,21 ± 3,34	10,77 ± 2,20	0,0001	6,25 ± 2,07	3,67 ± 1,40	0,0001
C20:5;5,8,11,14,17 (эйкозопентаеновая) C20:5;5,8,11,14,17 (eicosapentaenoic)	0,80 ± 0,51	0,64 ± 0,68	0,186	0,63 ± 0,48	0,38 ± 0,34	0,007
C22:4;7,10,13,16 (докозатетраеновая) C22:4;7,10,13,16 (docosatetraenoic)	2,75 ± 1,34	1,77 ± 0,71	0,0001	0,29 ± 0,30	0,21 ± 0,21	0,097
C22:5;7,10,13,16,19 (докозопентаеновая) C22:5;7,10,13,16,19 (docosapentaenoic)	1,85 ± 0,90	1,15 ± 0,46	0,0001	0,42 ± 0,25	0,21 ± 0,12	0,0001
C22:6;4,7,10,13,16,19 (докозагексаеновая) C22:6;4,7,10,13,16,19 (docosahexaenoic)	3,98 ± 1,81	2,13 ± 1,00	0,0001	1,63 ± 0,82	0,64 ± 0,44	0,0001

Таблица 3. Содержание видов жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови у пациентов с колоректальным раком и в группе сравнения ($M \pm SD$), %

Table 3. Levels of different types of fatty acids in erythrocyte membranes and serum in patients with colorectal cancer and the control groups ($M \pm SD$), %

Жирные кислоты Fatty acids	Мембраны эритроцитов Erythrocyte membranes			Сыворотка крови Serum		
	Основная группа ($n = 100$) Study group ($n = 100$)	Контрольная группа ($n = 24$) Control group ($n = 24$)	p	Основная группа ($n = 100$) Study group ($n = 100$)	Контрольная группа ($n = 24$) Control group ($n = 24$)	p
Насыщенные Saturated	43,20 ± 5,60	47,35 ± 3,96	0,0001	32,10 ± 4,50	35,38 ± 7,99	0,059
Ненасыщенные Unsaturated	56,80 ± 5,60	52,66 ± 3,96	0,0001	67,90 ± 4,50	64,63 ± 8,01	0,059
Мононенасыщенные Monounsaturated	18,45 ± 3,14	20,66 ± 3,05	0,005	23,35 ± 3,53	23,08 ± 4,56	0,409
Полиненасыщенные Polyunsaturated	38,36 ± 7,08	32,0 ± 5,1	0,0001	44,55 ± 5,65	41,55 ± 10,39	0,131
Омега-3 Omega-3	6,57 ± 3,31	4,10 ± 1,76	0,0001	3,07 ± 1,54	1,56 ± 0,89	0,0001
Омега-6 Omega-6	29,64 ± 8,42	27,77 ± 4,44	0,086	40,0 ± 9,05	38,35 ± 13,06	0,307
Омега-3 (эйкозапентаеновая + докозагексаеновая) Omega-3 (eicosapentaenoic + docosahexaenoic)	4,77 ± 2,09	2,77 ± 1,47	0,0001	2,26 ± 1,13	1,04 ± 0,74	0,0001
Омега-6/омега-3 Omega-6/omega-3	5,41 ± 2,72	7,89 ± 2,96	0,002	15,67 ± 6,81	29,26 ± 12,26	0,0001
Насыщенные/ненасыщенные Saturated/unsaturated	0,78 ± 0,18	0,91 ± 0,14	0,001	0,48 ± 0,10	0,57 ± 0,23	0,057
Насыщенные/полиненасыщенные Saturated/polyunsaturated	1,19 ± 0,37	1,53 ± 0,33	0,0001	0,74 ± 0,21	0,98 ± 0,60	0,067

($p = 0,059$), а соотношение насыщенные/ненасыщенные ЖК было ниже при КРР как для мембран эритроцитов ($p < 0,001$), так и для сыворотки крови ($p = 0,057$).

Совокупность **мононенасыщенных (моноеновых) ЖК** в мембранах эритроцитов при КРР оказалась достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p = 0,005$), не различаясь в сыворотке крови. Подобное распределение касалось пальмитолеиновой С16:1;7 (цис-7-гексадекановой) ($p = 0,038$), пальмитолеиновой С16:1;9 (цис-9-гексадекановой) ($p = 0,012$) с тенденцией к повышению последней в сыворотке крови ($p = 0,079$) и элаидиновой С18:1;t9 (транс-9-октадекановой) ($p = 0,014$) ЖК. Уровень олеиновой С18:1;c9 (цис-9-октадекановой) ЖК имел тенденцию к снижению в мембранах эритроцитов пациентов основной группы.

Сумма **ПНЖК** достоверно преобладала в мембранах эритроцитов пациентов основной группы ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной, в сыворотке крови отмечена тенденция к повышению, не достигающая уровня достоверности. Различия в группах по соотношению насыщенные/ПНЖК в мембранах эритроцитов

оказались высокодостоверны ($p < 0,0001$), в сыворотке крови этот индекс имел лишь тенденцию к снижению у пациентов с КРР ($p = 0,067$).

В отношении **диеновых ЖК** отмечены разнонаправленные тренды. Уровень гексадекадиеновой ЖК (С16:2;9,12) недостоверно был повышен у пациентов основной группы в мембранах эритроцитов и несколько снижен в сыворотке крови. При этом содержание докодиеновой кислоты (С20:2;11,14) оказалось высокодостоверно повышено при КРР как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови ($p < 0,0001$). Это одна из немногих ЖК с одинаковой направленностью изменений в сыворотке крови и мембранах эритроцитов и высокой степенью достоверности различий. В то же время уровень линолевой (октадекадиеновой) кислоты С18:2;9,12 оказался достоверно ниже в мембранах эритроцитов пациентов с КРР ($p = 0,015$) с подобной тенденцией в сыворотке крови.

Уровни **триеновых ЖК** оказались повышенными при КРР как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови. Если для α -линоленовой (октадекатриеновой)

кислоты С18:3;6,9,12 достоверные различия касались лишь мембран эритроцитов ($p = 0,014$), то содержание дигомо- γ -линоленовой кислоты С20:3;8,11,14 высоко достоверно превышало таковое у лиц контрольной группы в мембранах эритроцитов и сыворотке крови ($p < 0,0001$).

Для большей части тетра-, пента-, гексаеновых ЖК сохранялось достоверное повышение в мембранах эритроцитов и сыворотке крови у пациентов с КРР по сравнению с контрольной группой. Это касалось арахидоновой (эйкозатетраеновой) С20:4;5,8,11,14; докозапентаеновой С22:5;7,10,13,16,19; ДНА С22:6;4,7,10,13,16,19 ЖК ($p < 0,0001$). Однако для ряда ПНЖК (ЕРА С20:5;5,8,11,14,17) достоверное ($p = 0,007$) повышение отмечено только в сыворотке крови, хотя и в мембранах эритроцитов наблюдалась та же тенденция. Для докозатетраеновой 7,10,13,16–22:4 кислоты выявлена инверсная ситуация – уровень ее был достоверно выше в мембранах эритроцитов пациентов с КРР ($p < 0,0001$), а в сыворотке отмечена лишь тенденция к повышению ($p = 0,097$).

Уровень суммы омега-3 ЖК был достоверно выше у пациентов с КРР как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови ($p < 0,0001$). Это относилось и к 2 наиболее важным омега-3 ПНЖК – ЕРА и ДНА ($p < 0,0001$).

Суммы омега-6 ПНЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке больных КРР демонстрировали лишь тенденцию к повышению по сравнению с лицами контрольной группы, не достигая уровня достоверности.

Следует отметить, что соотношение омега-6/омега-3 у пациентов с КРР оказалось ниже как в мембранах эритроцитов ($p = 0,002$), так и в сыворотке крови ($p < 0,0001$).

Таким образом, при сравнении пациентов основной и контрольной групп выявлены следующие закономерности: сниженные уровни большинства насыщенных, мононенасыщенных ЖК и повышенные – ПНЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови. Уровни омега-3 ПНЖК при КРР превышали таковые у здоровых лиц как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови; для омега-6 ПНЖК отмечена лишь тенденция к повышению, при этом соотношение омега-6/омега-3 ПНЖК было ниже при КРР, чем в контрольной группе. Уровень ЖК мембран эритроцитов более достоверно и по большему числу показателей отражал имеющиеся различия между группами, чем таковой в сыворотке крови. Наиболее дискриминирующими показателями между пациентами основной и контрольной групп как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови, оказались уровни С20:2;11,14 (докодиеновой), С20:3;8,11,14 (дигомо- γ -линоленовой), С20:4;5,8,11,14 (эйкозатетраеновой, арахидоновой), С22:5;7,10,13,16,19 (докозапентаеновой), С22:6;4,7,10,13,16,19 (ДНА) ПНЖК.

Вместе с тем выявлены ЖК, уровень которых оказался инверсным по сравнению с общим трендом: тенденции к повышению в мембранах эритроцитов

и сыворотке крови у пациентов с КРР насыщенных ЖК – стеариновой ЖК (С18:0), арахидоновой (эйкозеновая С20:0) и снижение ненасыщенной ЖК – линолевой (октадекадиеновой) С18:2;9,12.

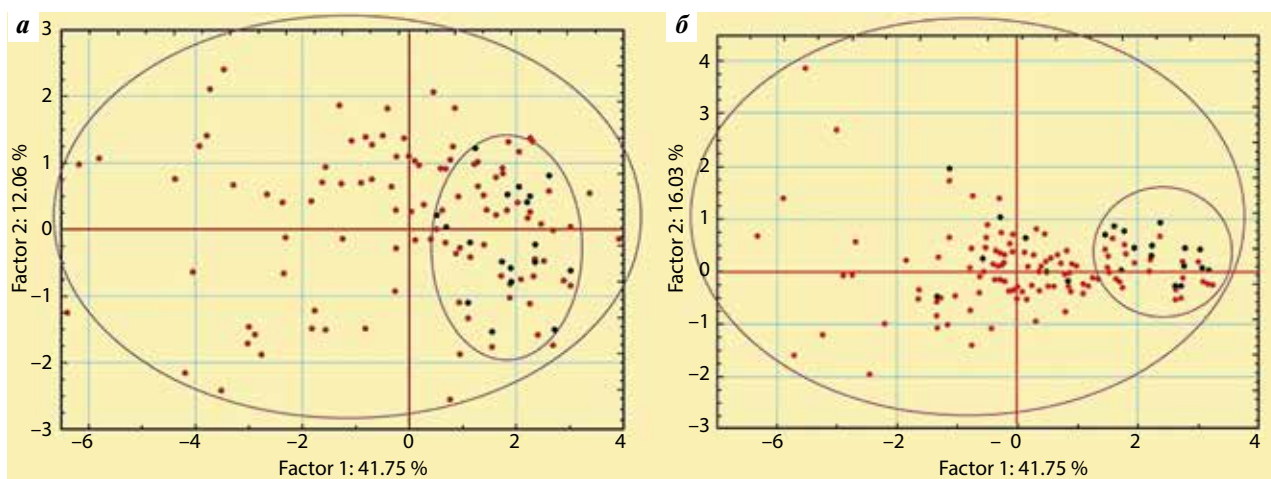
При проведении компонентного анализа уровней ЖК в мембранах эритроцитов выявлено, что наибольшее дифференцирование пациентов основной и контрольной групп идет по соотношению насыщенные/ненасыщенные ЖК (с более высоким содержанием ненасыщенных ЖК у пациентов с КРР). Перечень ЖК, ассоциированных с контрольной группой, имеет определенную очерченную область, в то время как метаболиты пациентов с КРР распределены более широко (см. рисунок). Очевидно, это связано с неоднородностью в основной группе в связи с различными стадиями заболевания, отличающимися по значимым ЖК. Дифференцирующими ЖК у пациентов основной и контрольной групп в мембранах эритроцитов оказались С20:0, 20:2, 20:3, 20:4, 22:4, 22:5, 22:6, уровни которых были выше, и С12-17:0, 16:1, 18:1, 18:2, содержание которых оказалось ниже у пациентов с КРР, чем у здоровых лиц (см. рисунок а). В отношении сыворотки крови наибольший вклад в различие между группами внесли все омега-3 ПНЖК (С20:5, 22:5, 22:6), а также показатель соотношения омега-6/омега-3 ЖК (см. рисунок б).

Обсуждение

Достоверно более высокие уровни ХС ЛПНП и низкие уровни ХС ЛПВП у пациентов основной группы по сравнению с контрольной, установленные в настоящей работе при исследовании липидного профиля сыворотки крови, согласуются с результатами работы S. Ghuman и соавт. Кроме того, у больных КРР с отдаленными метастазами выявлены достоверно более высокие уровни триглицеридов, ХС ЛПНП и соотношения ХС ЛПНП/ХС ЛПВП по сравнению с пациентами без метастазов [14].

Результаты проспективного исследования типа «случай–контроль» (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, EPIC, 2014) показали, что концентрации ХС ЛПВП и аполипопротеина А1 отрицательно связаны с риском развития рака толстой кишки [20]. Напротив, по данным N. Agnihotri и соавт., увеличение потребления общего жира, холестерина, насыщенных жиров и красного мяса тесно связано с развитием КРР [21].

Снижение уровней насыщенных, мононенасыщенных ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови и повышение уровня ненасыщенных ЖК у пациентов с КРР в отличие от условно здоровых лиц, вероятно, связаны с выраженными метаболическими сдвигами, ассоциированными с быстрым ростом опухолевых клеток [22]. Роль свободных радикалов (кислорода, оксида азота) в перекисном окислении липидов и дальнейшем образовании пероксинитрита, который участвует в иницировании канцерогенеза в толстой кишке, отмечалась в работе D.J. Bentley и соавт. [13].



Компонентный анализ дифференцирования жирных кислот в мембранах эритроцитов (а) и сыворотке крови (б) у пациентов основной и контрольной групп. Черные точки в малом круге — дифференцирующие жирные кислоты, ассоциированные с контрольной группой; красные точки, очерченные в большой круг, — дифференцирующие жирные кислоты, ассоциированные с основной группой

Component analysis of fatty acid differentiation in erythrocyte membranes (a) and serum (b) in patients of the study and control groups. Black dots in a small circle represent differentiating fatty acids associated with the control group; red dots in large circle — fatty acids associated with the study group

Активация перекисного окисления липидов может индуцировать мутацию p53, приводящую к развитию язвенного колита, ассоциированного с КРР [23]. Снижение уровня насыщенных ЖК как структурных компонентов мембран, возможно, связано с их повышенным расходом в качестве энергетического топлива в процессе бета-окисления в митохондриях [24].

В настоящем исследовании выявлена тенденция к повышению уровня стеариновой кислоты C18:0 и достоверное повышение уровня арахидоновой кислоты C20:0 в эритроцитах при КРР. По данным ряда исследований, в настоящее время диетические поступления мяса, животных жиров и/или насыщенных ЖК, таких как C16:0, C18:0, C20:0, значительно увеличились из-за распространения западных диет [25, 26]. Высокое потребление насыщенных ЖК может повышать риск развития КРР через увеличение производства желчных кислот и роста концентрации диацилглицерина [8, 27]. Однако последние сообщения по этому поводу в Японии, американских и европейских странах противоречивы [10, 28–30]. В мембранах эритроцитов уровень C18:0 оказался выше у больных КРР, чем у пациентов без КРР [31], хотя данные авторов неоднозначны [32–36].

Снижение уровня пальмитиновой кислоты у пациентов с КРР в настоящей работе, возможно, связано с повышенным расходом кислоты в процессе пальмитоилирования — посттрансляционной модификации белков, которая состоит из обратимого добавления пальмитата и других длинноцепочечных ЖК к белкам на остатках серосодержащей аминокислоты с помощью тиоэфирной связи. Подобное ацилирование секретрируемых сигнальных белков Hedgehog (Hh), Wnt приводит к значительному возрастанию их активности с последующим влиянием на пролиферацию, дифференциацию и миграцию клеток. Это существенный

факт, поскольку сигнальный путь Wnt признан одним из ключевых в канцерогенезе рака толстой кишки [37].

Ацилирование миристиновой кислотой, при котором кислота ковалентно прикрепляется к N-концевому остатку через амидную связь, является, как правило, необратимой модификацией белка [38]. N-миристолированные белки обладают множеством функций и играют важную роль в нескольких сигнальных каскадах. Так, повышение экспрессии MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich protein C-Kinase Substrate) при миристоилировании ассоциировано с метастазированием при КРР [39]. Некоторые N-миристоилированные белки подвергаются дополнительным жирным ацильным модификациям путем присоединения пальмитоильных групп к цистеинам через обратимые тиоэфиры. Пример этих ацилированных белков — члены Src-семейства тирозинкиназ, которые регулируют специфические онкогенные сигнальные пути, важные для прогрессирования рака толстой кишки [40]. Расход миристиновой кислоты, связанный с этими процессами, очевидно, является одной из причин снижения ее уровня у пациентов с КРР.

Данные о роли мононенасыщенных ЖК (их уровни достоверно снижены у пациентов с КРР в мембранах эритроцитов и сыворотке по результатам настоящей работы) в канцерогенезе немногочисленны [15]. Мы выявили достоверное снижение в мембранах эритроцитов уровня омега-6 ЖК — γ -линолевой кислоты C18:2;9,12 с тенденцией к его снижению в сыворотке крови. Линолевая кислота (18:2n-6) приобретает ненасыщенность и удлиняется до арахидоновой кислоты (20:4n-6) и затем превращается в омега-6 ПНЖК — производные эйкозаноидов [3, 8]. Предполагается, что каскад арахидоновой кислоты играет ключевую роль в развитии КРР. COX-2 (циклооксигеназа 2) — ключевой провоспалительный фермент — отвечает за образование

простагландинов из арахидоновой кислоты. Известно, что СОХ-2 чрезмерно экспрессирована в большей части случаев КРР и воспалительных заболеваний кишечника и способствует прогрессированию КРР [41].

В настоящем исследовании установлены достоверно более высокие уровни суммы омега-3 ПНЖК в сыворотке крови и мембранах эритроцитов у пациентов с КРР по сравнению с условно здоровыми лицами. Уровни совокупности омега-6 ПНЖК имели лишь тенденцию к повышению у больных КРР, более низкие соотношения омега-6/омега-3 ПНЖК при КРР свидетельствуют в пользу большего роста уровней омега-3 ЖК.

Эти данные расходятся с результатами целого ряда исследований, в которых уровни омега-3 ЖК ассоциированы с протективным действием в отношении рака толстой кишки, в то время как омега-6 оказывают противоположный эффект [42, 43]. Показано, что омега-3 ПНЖК уменьшает рост и дифференцировку раковых клеток путем подавления выработки арахидоновой кислоты и снижения биосинтеза эйкозаноидов [44–46]. Они также ингибируют канцерогенез толстой кишки путем уменьшения экспрессии КРР и p21 RAS, тогда как для омега-6 ПНЖК продемонстрирован противоположный эффект [47, 48]. По данным S. V. Rifkin и соавт., рыба, богатая EPA (20:5n-3) и DHA (22:6n-3) ЖК, снижает риск развития КРР [10]. EPA и DHA как из рыбы, так и метаболитированные из альфа-линоленовой кислоты (18:3n-3) растительных масел, превращаются в омега-3 ПНЖК – производные эйкозаноиды [28]. Следовательно, омега-3 ПНЖК, особенно омега-3 высоко ненасыщенные ЖК (HUFAs = EPA + докозапентаеновая кислота + DHA), считаются конкурирующими с омега-6 ПНЖК в механизме включения в состав фосфолипидов клеточных мембран и замену ПНЖК компонентов в мембранах [29]. Показано, что высокий уровень омега-3 ПНЖК в ткани снижает риск развития колоректальной аденомы [49].

В последние годы понимание роли омега-3 и омега-6 ПНЖК в развитии КРР во многом подвергается пересмотру. Это следствие целого ряда исследований, данные которых весьма разнятся. Противоречивая роль

омега-3 и омега-6 ПНЖК в развитии КРР обусловлена их уровнями в составе мембранных фосфолипидов. Так, при низкой концентрации омега-6 ПНЖК, являясь компонентами мембранных фосфолипидов клеток иммунной системы, проявляют себя как защитный фактор, однако при высокой концентрации омега-6 их производные эйкозаноиды, такие как PGE2, могут быть иммуносупрессорами. Омега-3 ПНЖК в мембране могут конкурировать с омега-6 ПНЖК в качестве субстратов ферментов циклооксигеназы и липоксигеназы. Они также могут уменьшить продукцию производных омега-6 – эйкозаноидов, таких как PGE2, которая требуется для нормальной функции Т-клеток, однако при высокой концентрации омега-3 их эффект будет иммуносупрессивным [50].

Также следует учитывать ассоциации уровня воспалительных цитокинов с уровнем ЖК сыворотки крови. Так, у пациентов с язвенным колитом уровни воспалительных цитокинов прямо коррелировали с уровнем насыщенных ЖК и обратно – с уровнями ПНЖК, EPA и DHA [51]. У пациентов с КРР выявлены прямые ассоциации уровня интерлейкина-6 с арахидоновой кислотой, интерферона гамма с C22:5, матриксной металлопротеиназой 7 – с отношением омега-6/омега-3 ПНЖК; напротив, матриксная металлопротеиназа 9 обратно коррелировала с уровнем C22:6, металлопротеиназа 2 – с уровнем C20:5, что свидетельствует о связи уровней ПНЖК в сыворотке крови с воспалением при КРР, а также их различной роли в регуляции иммунного ответа [2].

Заключение

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что у пациентов с КРР наблюдаются выраженные изменения состава и соотношения ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови, что может быть использовано для диагностики и лучшего понимания патогенетических механизмов прогрессирования заболевания. Однако требуются дальнейшие исследования, в том числе с учетом стадии заболевания, наличия и локализации метастазов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Brandao D., Ribeiro L. Dietary fatty acids modulation of human colon cancer cells: mechanisms and future perspectives. *Int J Food Sci Nutr* 2018;69(4):437–50. DOI: 10.1080/09637486.2017.1382456. PMID: 28984495.
- Jia H.J., Zhang P.J., Liu Y.L. et al. Relationship of serum polyunsaturated fatty acids with cytokines in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(8):2524–32. DOI: 10.3748/wjg.v22.i8.2524. PMID: 26937140.
- May-Wilson S., Sud A., Law P.J. et al. Pro-inflammatory fatty acid profile and colorectal cancer risk: a Mendelian randomisation analysis. *Eur J Cancer* 2017;84:228–38. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.07.034. PMID: 28829991.
- Arab L., Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr* 2002;5(6A):865–71. PMID: 12638594.
- Zeleniuch-Jacquotte A., Chajes V., Van Kappel A.L. et al. Reliability of fatty acid composition in human serum phospholipids. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(5):367–72. PMID: 10822282.
- Katan M.B., van Birgelen A., Deslypere J.P. et al. Biological markers of dietary intake, with emphasis on fatty acids. *Ann Nutr Metab* 1991;35(5):249–52.

- DOI: 10.1159/000177653.
PMID: 1776820.
7. Cottet V., Vaysse C., Scherrer M.L. et al. Fatty acid composition of adipose tissue and colorectal cancer: a case-control study. *American J Clin Nutr* 2015;101(1): 192–201. DOI: 10.3945/ajcn.114.088948. PMID: 25527763.
 8. Michalak A., Mosinska P., Fichna J. Polyunsaturated fatty acids and their derivatives: therapeutic value for inflammatory, functional gastrointestinal disorders, and colorectal cancer. *Front Pharmacol* 2016;7:459–67. DOI: 10.3389/fphar.2016.00459. PMID: 27990120.
 9. Mika A., Kobiela J., Czumaj A. et al. Hyper-elongation in colorectal cancer tissue – cerotic acid is a potential novel serum metabolic marker of colorectal malignancies. *Cell Physiol Biochem* 2017;41(2):722–30. DOI: 10.1159/000458431. PMID: 28214830.
 10. Rifkin S.B., Shrubsole M.J., Cai Q. et al. PUFA levels in erythrocyte membrane phospholipids are differentially associated with colorectal adenoma risk. *British J Nutr* 2017;117(11):1615–22. DOI: 10.1017/S0007114517001490. PMID: 28660850.
 11. Crotti S., Agnoletto E., Cancemi G. et al. Altered plasma levels of decanoic acid in colorectal cancer as a new diagnostic biomarker. *Anal Bioanal Chem* 2016;408(23):6321–8. DOI: 10.1007/s00216-016-9743-1. PMID: 27379390.
 12. Ogura T., Takada H., Okuno M. et al. Fatty acid composition of plasma, erythrocytes and adipose: their correlations and effects of age and sex. *Lipids* 2010;45(2):137–44. DOI: 10.1007/s11745-010-3386-3. PMID: 20094809.
 13. Bentley D.J., Ackerman J., Clifford T., Slattery K.S. Acute and chronic effects of antioxidant supplementation on exercise performance. In: *Antioxidants in sport nutrition*. Ed. M. Lamprecht. Boca Raton, Finland, 2015. P. 125.
 14. Ghuman S., Van Hemelrijck M., Garmo H. et al. Serum inflammatory markers and colorectal cancer risk and survival. *Br J Cancer* 2017;116(10):1358–65. DOI: 10.1038/bjc.2017.96. PMID: 28376082.
 15. Han S., Schroeder E.A., Silva-Garcia C.G. et al. Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to *C. elegans* lifespan. *Nature* 2017;544(7649):185–90. DOI: 10.1038/nature21686. PMID: 28379943.
 16. Shashkov M.V., Sidelnikov V.N. Properties of columns with several pyridinium and imidazolium ionic liquid stationary phases. *J Chromatogr A* 2013;1309:56–63. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.08.030. PMID: 23958690.
 17. Kang J.X., Wang J. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochem* 2005;6:5–13. DOI: 10.1186/1471-2091-6-5. PMID: 15790399.
 18. Vétvik K.K., Sonerud T., Lindeberg M. et al. Globular adiponectin and its downstream target genes are up-regulated locally in human colorectal tumors: *ex vivo* and *in vitro* studies. *Metabolism* 2014;63(5):672–81. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.02.001. PMID: 24636346.
 19. Zhang P., Wen X., Gu F. et al. Role of serum polyunsaturated fatty acids in the development of colorectal cancer. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(9):15900–9. PMID: 26629093.
 20. Demignot S., Beilstein F., Morel E. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie* 2014;96:48–55. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.009. PMID: 23871915.
 21. Agnihotri N., Sharma G., Rani I. et al. Fish oil prevents colon cancer by modulation of structure and function of mitochondria. *Biomed Pharmacother* 2016;82:90–7. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.04.045. PMID: 27470343.
 22. Ohmori H., Fujii K., Kadochi Y. et al. Elaidic acid, a trans-fatty acid, enhances the metastasis of colorectal cancer cells. *Pathobiology* 2017;84(3):144–51. DOI: 10.1159/000449205. PMID: 27832659.
 23. Katkooi V.R., Manne U., Chaturvedi L.S. et al. Functional consequence of the p53 codon 72 polymorphism in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8(44):76574–86. DOI: 10.18632/oncotarget.20580. PMID: 29100333.
 24. Bozek K., Khramueva E.E., Reznick J. et al. Lipidome determinants of maximal lifespan in mammals. *Sci Rep* 2017;7(1):5–17. DOI: 10.1038/s41598-017-00037-7. PMID: 28127055.
 25. Fretts A.M., Mozaffarian D., Siscovick D.S. et al. Associations of plasma phospholipid SFAs with total and cause-specific mortality in older adults differ according to SFA chain length. *J Nutr* 2016;146(2):298–305. DOI: 10.3945/jn.115.222117. PMID: 26701797.
 26. Yang Q., Wang S., Ji Y. et al. Dietary intake of n-3 PUFAs modifies the absorption, distribution and bioavailability of fatty acids in the mouse gastrointestinal tract. *Lipids Health Dis* 2017;16(1):10–21. DOI: 10.1186/s12944-016-0399-9. PMID: 28095863.
 27. Igal R.A. Stearoyl CoA desaturase-1: new insights into a central regulator of cancer metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2016;1861(12 Pt A):1865–80. DOI: 10.1016/j.bbali.2016.09.009. PMID: 27639967.
 28. Fazio C., Piazzi G., Vitaglione P. et al. Inflammation increases NOTCH1 activity via MMP9 and is counteracted by Eicosapentaenoic Acid-free fatty acid in colon cancer cells. *Sci Rep* 2016;6: 20670–9. DOI: 10.1038/srep20670. PMID: 26864323.
 29. Kato I., Vázquez A., Moyerbrailean G. et al. Nutritional correlates of human oral microbiome. *J Am Coll Nutr* 2017;36(2):88–98. DOI: 10.1080/07315724.2016.1185386. PMID: 27797671.
 30. Kraja B., Muka T., Ruiter R. et al. Dietary fiber intake modifies the positive association between n-3 PUFA intake and colorectal cancer risk in a caucasian population. *J Nutr* 2015;145(8):1709–16. DOI: 10.3945/jn.114.208462. PMID: 26041678.
 31. Xia H., Ma S., Wang S., Sun G. Meta-analysis of saturated fatty acid intake and breast cancer risk. *Medicine* 2015;94(52):e2391–8. DOI: 10.1097/MD.0000000000002391. PMID: 26717389.
 32. Angerer T.B., Magnusson Y., Landberg G., Fletcher J.S. Lipid heterogeneity resulting from fatty acid processing in the human breast cancer microenvironment identified by GCIB-ToF-SIMS Imaging. *Anal Chem* 2016;88(23):11946–54. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03884. PMID: 27783898.
 33. Cruz-Gil S., Sanchez-Martinez R., Gomez de Cedron M. et al. Targeting the lipid metabolic axis ACSL/SCD in colorectal cancer progression by therapeutic miRNAs: miR-19b-1 role. *J Lipid Res* 2018;59(1):14–24. DOI: 10.1194/jlr.M076752. PMID: 29074607.
 34. Doria M.L., Ribeiro A.S., Wang J. et al. Fatty acid and phospholipid biosynthetic pathways are regulated throughout mammary epithelial cell differentiation and correlate to breast cancer survival. *FASEB J* 2014;28(10):4247–64. DOI: 10.1096/fj.14-249672. PMID: 24970396.
 35. Shaikh S., Channa N.A., Talpur F.N. et al. Radiotherapy improves serum fatty acids and lipid profile in breast cancer. *Lipids Health Dis* 2017;16(1):92–9. DOI: 10.1186/s12944-017-0481-y. PMID: 28521812.
 36. Zhao J., Zhi Z., Wang C. et al. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncol Rep* 2017;38(4):2105–15. DOI: 10.3892/or.2017.5864. PMID: 28765876.
 37. Gradilla A.C., Sanchez-Hernandez D., Brunt S., Scholpp L. From top to bottom:

- cell polarity in Hedgehog and Wnt trafficking. *BMC Biol* 2018;16(1):37–46. DOI: 10.1186/s12915-018-0511-x. PMID: 29636056.
38. Stillwell W. An introduction to biological membranes. Composition, structure and function. 2nd edn. UK: Elsevier, 2016.
39. Rombouts K., Carloni V., Mello T. et al. Myristoylated Alanine-Rich protein Kinase C Substrate (MARCKS) expression modulates the metastatic phenotype in human and murine colon carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2013;333(2):244–52. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.040. PMID: 23376641.
40. Sancier F., Dumont A., Sirvent A. et al. Specific oncogenic activity of the src-family tyrosine kinase c-Yes in colon carcinoma cells. *PLoS One* 2011;6(2):e17237–44. DOI: 10.1371/journal.pone.0017237. PMID: 21390316.
41. Tae C.H., Kim S.E., Jung S.A. et al. Involvement of adiponectin in early stage of colorectal carcinogenesis. *BMC Cancer* 2014;14:811–9. DOI: 10.1186/1471-2407-14-811. PMID: 25370174.
42. Habermann N., Schon A., Lund E.K., Gleis M. Fish fatty acids alter markers of apoptosis in colorectal adenoma and adenocarcinoma cell lines but fish consumption has no impact on apoptosis-induction *ex vivo*. *Apoptosis* 2010;15(5):621–30. DOI: 10.1007/s10495-010-0459-y. PMID: 20107900.
43. Lee J.Y., Sim T.B., Lee J.E., Na H.K. Chemopreventive and chemotherapeutic effects of fish oil derived omega-3 polyunsaturated fatty acids on colon carcinogenesis. *Clin Nut Res* 2017;6(3):147–60. DOI: 10.7762/cnr.2017.6.3.147. PMID: 28770178.
44. Tuncer S., Banerjee S. Eicosanoid pathway in colorectal cancer: recent updates. *World J Gastroenterol* 2015;21(41):11748–66. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11748. PMID: 26557000.
45. Dupertuis Y.M., Meguid M.M., Pichard C. Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10(4):427–32. DOI: 10.1097/MCO.0b013e3281e2c9d4. PMID: 17563460.
46. Vasudevan A., Yu Y., Banerjee S. et al. Omega-3 fatty acid is a potential preventive agent for recurrent colon cancer. *Cancer Prev Res* 2014;7(11):1138–48. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0177. PMID: 25193342.
47. Lim K., Han C., Dai Y. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking beta-catenin and cyclooxygenase-2. *Mol Cancer Ther* 2009;8(11):3046–55. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0551. PMID: 19887546.
48. Ma C.J., Wu J.M., Tsai H.L. et al. Prospective double-blind randomized study on the efficacy and safety of an n-3 fatty acid enriched intravenous fat emulsion in postsurgical gastric and colorectal cancer patients. *Nutr J* 2015;14:9–14. DOI: 10.1186/1475-2891-14-9. PMID: 25609264.
49. Kim J., Oh S.W., Kim Y.S. et al. Association between dietary fat intake and colorectal adenoma in Korean adults: a cross-sectional study. *Medicine* 2017;96(1):e5759–66. DOI: 10.1097/MD.0000000000005759. PMID: 28072719.
50. Maccadei S., Masella R., Mileo A.M., Gessani S. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as immunomodulators in colorectal cancer: new potential role in adjuvant therapies. *Front Immunol* 2016;7:486–97. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00486. PMID: 27895640.
51. Wiese D.M., Horst S.N., Brown C.T. et al. Serum fatty acids are correlated with inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *PLoS One* 2016;11(5):e0156387–94. DOI: 10.1371/journal.pone.0156387. PMID: 27227540.

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность сотрудникам ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер», оказавшим содействие и помощь при обследовании пациентов.

Acknowledgment. Authors express special thanks to the staff of the Novosibirsk Regional Oncology Dispensary, who helped with the examination of patients.

Вклад авторов

М.В. Кручинина: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

В.Н. Кручинин: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

Я.И. Прудникова: получение данных для анализа;

А.А. Громов: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

М.В. Шашков: получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический);

А.С. Соколова: получение данных для анализа, анализ полученных данных.

Authors' contributions

M.V. Kruchinina: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing, reviewing of publications of the article's theme;

V.N. Kruchinin: article writing, reviewing of publications of the article's theme;

Ya.I. Prudnikova: obtaining data for analysis;

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

M.V. Shashkov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data (including statistical);

A.S. Sokolova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data.

ORCID авторов

М.В. Кручинина: <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

В.Н. Кручинин: <https://orcid.org/0000-0002-9905-9031>

М.В. Шашков: <https://orcid.org/0000-0002-2688-8410>

А.С. Соколова: <https://orcid.org/0000-0001-5227-9996>

ORCID of authors

M.V. Kruchinina: <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

V.N. Kruchinin: <https://orcid.org/0000-0002-9905-9031>

M.V. Shashkov: <https://orcid.org/0000-0002-2688-8410>

A.S. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0001-5227-9996>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Государственного Задания по теме № 0324-2018-0002.

Financing. The study was performed with the support of State Task on the topic No. 0324-2018-0002.

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

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

Экспрессия раково-тестикулярных генов *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой, их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидива

А.А. Солодовник¹, А.С. Мкртчян², В.А. Мисюрин¹, В.В. Тихонова¹, Ю.П. Финашутина¹, Н.Н. Касаткина¹, О.Н. Солопова¹, О.М. Вотякова¹, О.Ю. Якимович¹, О.М. Володина¹, М.Ю. Кичигина¹, Е.Г. Медведевская¹, А.С. Антипова¹, И.З. Заводнова¹, А.А. Семенова¹, Г.Р. Аракелян¹, Ю.Е. Рябухина¹, О.А. Коломейцев¹, А.Д. Ширин¹, Е.А. Османов³, А.В. Мисюрин^{1,2}

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

²ООО «Гено Технологии»; Россия, 17279 Москва, ул. Профсоюзная, 104;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Алена Александровна Солодовник alionka1363@rambler.ru

Цель исследования — изучить прогностическое значение экспрессии раково-тестикулярных генов (РТГ) *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой (ММ) и их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидивов, определить их влияние на такие клинические показатели, как уровни лактатдегидрогеназы, лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина и бета-2-микроглобулина.

Материалы и методы. Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на комплементарной ДНК, полученной из образцов костного мозга 77 больных с установленным диагнозом ММ. Статистический анализ выполняли с помощью программного пакета *Statistica 10.0*. Для построения кривых общей выживаемости использовали метод Каплана–Майера.

Результаты. Проведено исследование для определения уровня экспрессии РТГ *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* в группе больных ММ. В группу вошли как первичные пациенты, так и получающие лекарственную противоопухолевую терапию при ММ. Согласно *log-rank*-тесту существенное влияние на показатели общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования/рецидива заболевания оказывает экспрессия любого из РТГ *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *PASD1*. Также определено, что при экспрессии некоторых РТГ уровни креатинина, кальция и бета-2-микроглобулина были на порядок выше, чем у больных без экспрессии.

Ключевые слова: раково-тестикулярный ген, множественная миелома, общая выживаемость, безрецидивная выживаемость

Для цитирования: Солодовник А.А., Мкртчян А.С., Мисюрин В.А. и др. Экспрессия раково-тестикулярных генов *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой, их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидива. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(2):62–70.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-62-70

Expression of cancer-testis genes *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* in patients with multiple myeloma, their influence on overall survival and relapse rate

A.A. Solodovnik¹, H.S. Mkrtychyan², V.A. Misyurin¹, V.V. Tikhonova¹, Yu.P. Finashutina¹, N.N. Kasatkina¹, O.N. Solopova¹, O.M. Votyakova¹, O.Yu. Yakimovich¹, O.M. Volodina¹, M.Yu. Kichigina¹, E.G. Medvedovskaya¹, A.S. Antipova¹, I.Z. Zavodnova¹, A.A. Semenova¹, G.R. Arakelyan¹, Yu.E. Ryabukhina¹, O.A. Kolomeytshev¹, A.D. Shirin¹, E.A. Osmanov³, A.V. Misyurin^{1,2}

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

²GeneTechnology; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Objective: to study the prognostic significance of the expression of cancer-testis (CT) genes *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* in patients with multiple myeloma (MM) and their influence on overall survival and relapse rate. To determine their effect on such clinical parameters as levels of lactate dehydrogenase, leucocytes, hemoglobin, calcium, albumen, creatinine, beta-2-microglobulin.

Materials and methods. Real-time polymerase chain reaction was performed on complementary DNA obtained from bone marrow of 77 patients with MM. The statistical analysis was performed using the Statistica 10.0 software package. To estimate prognostic values of the CT gene expression data were analyzed by the Kaplan – Meier method.

Results. The study was conducted to determine the level of expression of CT genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 in a group of patients with MM. The group included primary and receiving cancer treatment in MM patients. According to the log-rank criterion expression of any of the CT genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 exerts a significant influence on overall survival and progression-free survival/relapse. It was also determined that providing expression of some CT genes, the levels of creatinine, calcium, beta-2-microglobulin were much higher to compare with patients without expression.

Key words: cancer-testis genes, multiple myeloma, overall survival, progression-free survival

For citation: Solodovnik A.A., Mkrtychyan H.S., Misyurin V.A. et al. Expression of cancer-testis genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 in patients with multiple myeloma, their influence on overall survival and relapse rate. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(2):62–70.

Введение

Раково-тестикулярные гены (РТГ) представляют собой группу генов, экспрессия которых в норме ограничена здоровыми репродуктивными тканями взрослого человека и эмбриональными тканями. Экспрессия РТГ наблюдается в 40 % случаев различных типов опухолей [1]. Впервые термин «раково-тестикулярные антигены» (РТА) был упомянут в 1997 г. [2]. Однако обнаружены РТА были намного раньше, с 1980 г. и по настоящее время ведется их активное изучение и пополнение списка. Впервые они выделены и описаны при исследовании плоскоклеточной карциномы пищевода [2–5]. РТА можно разделить на 2 группы:

- кодируемые генами, расположенными на хромосоме X (X-РТА) [6];
- кодируемые генами, расположенными на всех других хромосомах, кроме X [5].

В группу X-РТА входит более половины всех известных РТА. Они представляют собой мультигенные семейства, которые часто организованы в кластеры, в отличие от остальных РТА, которые распределены по всему геному и представлены однокопийными генами [5, 7]. Функции многих РТА до сих пор остаются неизвестными, однако полагают, что эти белки принимают участие в регуляции клеточного цикла и процессов апоптоза. Результаты исследований экспрессии РТА также показали, что метилирование ДНК — один из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии РТА в половых и трансформированных клетках [7]. Отмечается, что в опухолях РТГ обладают особыми свойствами [5], именно поэтому многие из них обнаружены благодаря наличию спонтанного гуморального ответа к этим антигенам у больных со злокачественными новообразованиями [2, 5, 8]. Поскольку экспрессия РТГ ограничивается либо тканями мужской репродуктивной системы и эмбриональными тканями, где уровень экспрессии РТГ у здоровых лиц очень мал, либо опухолевыми клетками, где уровень их экспрессии значительно выше, а также благодаря антигенным свойствам, РТА являются перспективными объектами для использования в иммунотерапии. Кроме того,

некоторые из них считаются маркерами таких злокачественных новообразований, как рак яичников, шейки матки, молочной железы, легкого, мочевого пузыря, пищевода, меланомы, различных гематологических заболеваний и др. [9–17]. На сегодняшний день описано более 150 семейств РТГ, которые включают около 276 генов (<http://www.cta.lncc.br>).

Несмотря на современные химиотерапевтические средства и терапию моноклональными антителами, прогноз для многих пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, особенно с агрессивными заболеваниями, такими как диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома мантийной зоны, множественная миелома (ММ), остается неблагоприятным [18–21]. Тем не менее с каждым годом появляется все больше клинических испытаний, которые демонстрируют, что вакцины, содержащие продукты экспрессии РТГ, могут вызывать специфический иммунный ответ у больных лимфомами и ММ [22, 23].

Усовершенствования в лечении ММ привели к значительному увеличению выживаемости пациентов. Однако общая выживаемость (ОВ) редко превышает 4–5 лет [24]. Для молодых пациентов лечение основано на высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией стволовых клеток [25]. Минимальная остаточная болезнь является одной из основных проблем, для решения которой специфические терапевтические подходы, например иммунотерапия, могут быть полезны [26]. Помимо иммунотерапевтических преимуществ, РТА могут быть использованы в качестве маркеров для обнаружения злокачественного новообразования на более ранних сроках. В последнее десятилетие ведется активное изучение РТА в онкологии, в том числе при ММ, которая характеризуется выраженной клинической, цитогенетической и молекулярной гетерогенностью.

ММ — злокачественное В-клеточное лимфопролиферативное заболевание с клональной пролиферацией плазматических клеток в костном мозге и за его пределами. Несмотря на то, что полная ремиссия может быть достигнута у 25–50 % впервые

диагностированных больных, которым проводили высокодозную терапию мелфаланом и аутологичную трансплантацию стволовых клеток периферической крови, почти у всех пациентов наблюдаются рецидивы с медианой безрецидивной выживаемости (БРВ) 2–3 года [27]. Как правило, ранний рецидив связан с тем, что в результате проведенной терапии небольшое количество трансформированных плазматических клеток все же остается в кроветворной системе больного [28].

Цель исследования — используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени определить уровень экспрессии 9 РТГ (*PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASDI*) и оценить их влияние на показатели ОВ и скорость возникновения рецидивов ММ, а также влияние экспрессии этих РТГ на некоторые клинические биохимические показатели.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. Исследованы образцы костного мозга, взятые у 77 больных ММ (42 женщины, 35 мужчин). Все пациенты находились под наблюдением в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2016 по 2017 г. Медиана возраста составила 53 года. Максимальный срок наблюдения — 16,5 мес. В соответствии с законодательством России биоматериал от каждого пациента был получен при наличии информированного согласия на его использование.

Предварительная подготовка образцов костного мозга. Для удаления эритроцитов костный мозг обрабатывали гемолизирующим раствором (0,8 % NH_4Cl) в соотношении 1:14. Смесь инкубировали 15 мин при температуре +4 °С. Затем смесь центрифугировали 10 мин при 1600 об/мин. Образовавшийся супернатант удаляли, а оставшийся клеточный осадок растворяли в 1 мл гемолизирующего раствора; образовавшуюся смесь центрифугировали 5 мин при 2500 об/мин. Супернатант удаляли, а клеточный осадок использовали для выделения РНК.

Выделение РНК. В подготовленный клеточный материал добавляли 500 мкл лизирующего буфера (4 моль гуанидин тиоционата, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % N-лаурилсаркозила натрия и 0,1 моль 2-меркаптоэтанола) и перемешивали с помощью одноразового шприца с диаметром инъекционной иглы 1,1 мм (19G). Затем в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 1200 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость и добавляли равный объем изопропанола. Инкубацию РНК проводили в течение 1 ч при температуре –70 °С. После инкубации РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1200 об/мин, удаляли супернатант, оставшийся осадок дважды промывали в 80 % этаноле, высушивали в термостате при

температуре 37 °С и растворяли в деионизированной воде.

Получение комплементарной ДНК. Для синтеза комплементарной ДНК использовали 2 мкг матричной РНК, полученной на предыдущем этапе с применением ревертазы. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью фермента RevertAid Reverse Transcriptase и набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, указанных производителем. Для отжига использовали смесь вырожденных гексамерных нуклеотидов (Евроген, Россия). Для отрицательного контроля применяли рабочую смесь без добавления РНК.

Количественная ПЦР в реальном времени. Количественную ПЦР проводили с использованием рабочей смеси (40 ммоль трис-НСl, 100 ммоль КCl, 4 ммоль MgCl_2 , 1 ммоль каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 ммоль 2-меркаптоэтанола) и TaqДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу добавили по 5 мкл комплементарной ДНК, 350 нмоль прямого, 350 нмоль обратного праймера и 140 нмоль флуоресцентного зонда.

Исследование выполняли на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария).

Программа проведения реакции, для каждого из изучаемых генов, была следующей:

- «горячий старт»: 10 мин при температуре +95 °С;
 - денатурация: 20 с при температуре +95 °С;
 - отжиг праймеров и синтез: 60 с при температуре +60 °С.
- } 50 циклов

Статистический анализ полученных данных. Согласно критерию Колмогорова–Смирнова количественные данные имели нормальное распределение. Вследствие этого для дальнейшего статистического анализа использовали параметрические критерии. Для исследования связи экспрессии РТГ с количественными параметрами (уровень лактатдегидрогеназы, лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина, бета-2-микроглобулина) применяли *t*-критерий. ОВ и БРВ в зависимости от экспрессии любого из исследуемых РТГ анализировали по методу Каплана–Майера. Для построения кривых ОВ и БРВ продолжительность жизни больных рассчитывали с момента проведения первичного цитогенетического исследования до летального исхода или последней информации о больном. Для сравнения показателей ОВ для больных в клетках костного мозга, в которых обнаружена экспрессия РТГ и без таковой, использовали *log-rank*-тест. Количественные данные представлены в виде медианы значения и граничных значений, охваченных доверительным интервалом 0,95. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Вычисления выполняли с помощью программного пакета Statistica 10.0.

Результаты

В работе проанализированы влияние экспрессии некоторых РТГ на показатели ОБ и скорость возникновения рецидива у 77 больных ММ. График ОБ представлен на рис. 1. Медиана ОБ не достигнута.



Рис. 1. Общая выживаемость больных множественной миеломой (n = 77)
 Fig. 1. Overall survival of patients with multiple myeloma (n = 77)

При отсутствии экспрессии генов *NY-ESO1* ($p = 0,014$), *MAGE A6* ($p = 0,00048$), *MAGE A12* ($p = 0,04$) и *SSX1* ($p = 0,016$) показатели ОБ у больных ММ увеличиваются. Медиана ОБ у больных с экспрессией гена *NY-ESO1* составила 15,8 мес, а при отсутствии его экспрессии – не достигнута (рис. 2а); с экспрессией гена *MAGE A6* – 8,0 мес, при отсутствии его экспрессии – не достигнута (рис. 2б); с экспрессией гена *MAGE A12* – 8,0 мес, при отсутствии его экспрессии – 15,8 мес; с экспрессией генов *MAGE A12* и *SSX1* – 7,9 мес, при отсутствии их экспрессии – 15,8 мес (рис. 2в, г). Экспрессия генов *PRAME* ($p = 0,93$), *GAGE1* ($p = 0,68$), *SLLP1* ($p = 0,21$) и *PASD1* ($p = 0,24$) не влияет на параметры ОБ у больных ММ.

Рецидивы развиваются в более ранние сроки у пациентов с экспрессией генов *NY-ESO1* ($p = 0,011$), *MAGE A6* ($p = 0,012$), *MAGE A12* ($p = 0,041$), *SSX1* ($p = 0,017$) и *PASD1* ($p = 0,0013$). Медиана БРВ в группах больных ММ с экспрессией генов *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *SSX1* и *PASD1* независимо друг от друга составила 7,9 мес и с экспрессией гена *MAGE A12* – 16 мес (рис. 3). Медиана БРВ у больных без экспрессии генов *NY-ESO1* составила 13 мес, *MAGE A6* и *SSX1* – 16 мес. При

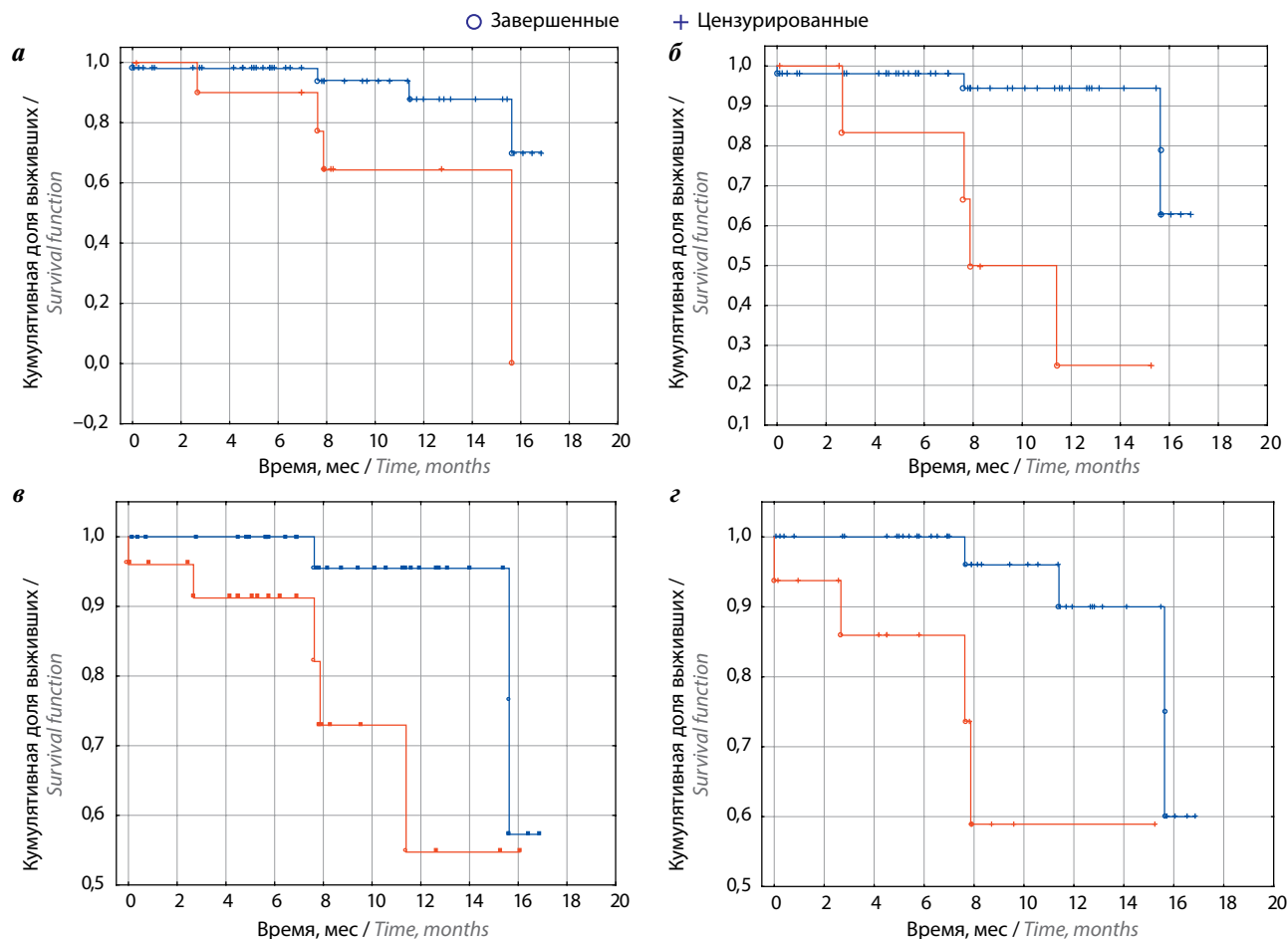


Рис. 2. Графики общей выживаемости у больных множественной миеломой (n = 77) с экспрессией (красные линии) и без нее (синие линии) следующих генов: а – *NY-ESO1* ($p = 0,014$); б – *MAGE A6* ($p = 0,0048$); в – *MAGE A12* ($p = 0,04$); г – *SSX1* ($p = 0,016$)
 Fig. 2. Overall survival plots for patients with multiple myeloma (n = 77) and with (red lines) and without (blue lines) expression of the following genes: а – *NY-ESO1* ($p = 0.014$); б – *MAGE A6* ($p = 0.0048$); в – *MAGE A12* ($p = 0.04$); г – *SSX1* ($p = 0.016$)

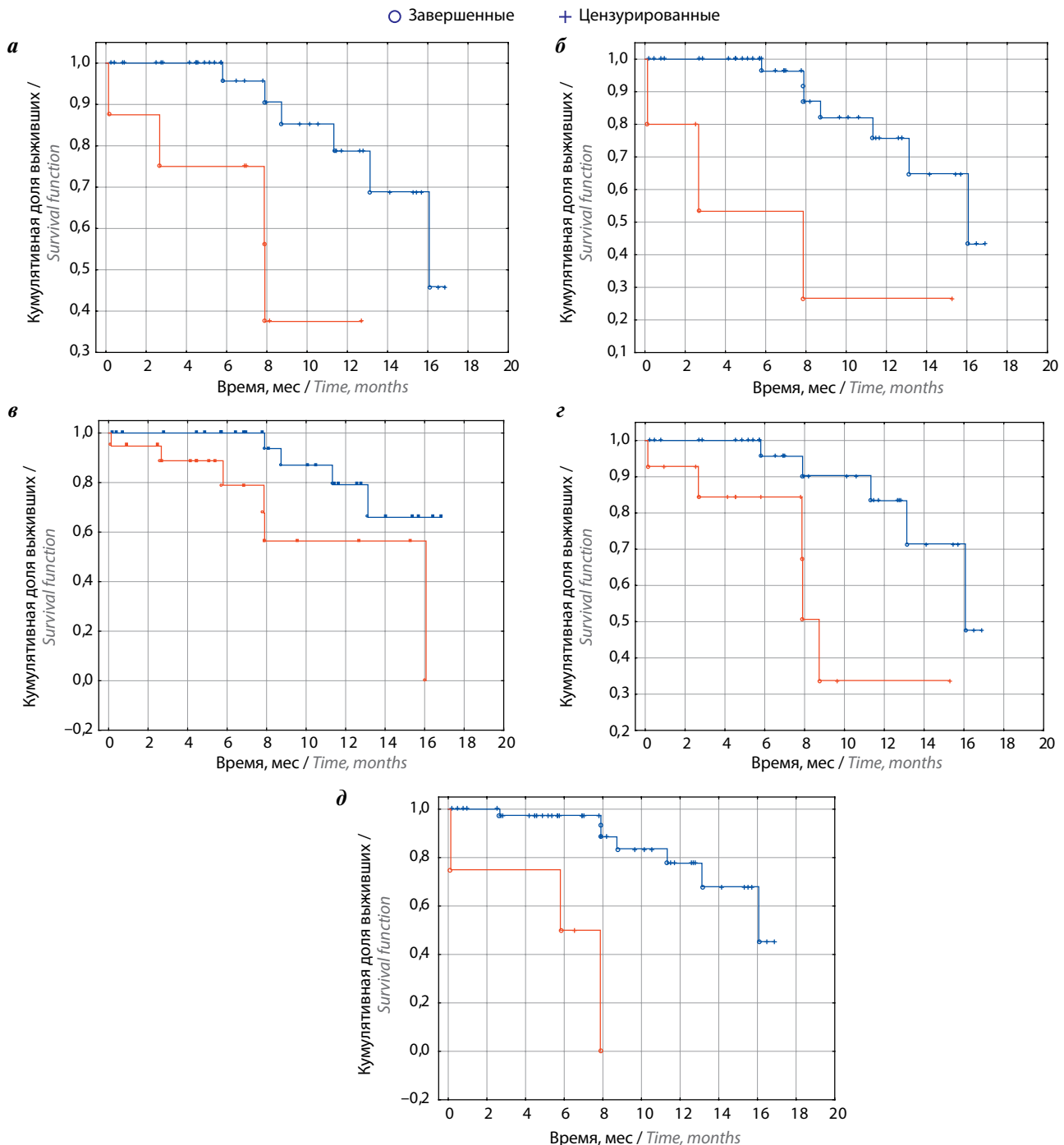


Рис. 3. Графики выживаемости без прогрессирования у больных множественной миеломой ($n = 77$) с экспрессией (красные линии) и без нее (синие линии) следующих генов: а – NY-ESO1 ($p = 0,011$); б – MAGE A6 ($p = 0,012$); в – MAGE A12 ($p = 0,041$); г – SSX1 ($p = 0,0017$); д – PASD1 ($p = 0,0013$)
Fig. 3. Progression-free survival plots for patients with multiple myeloma ($n = 77$) and with (red lines) and without (blue lines) expression of the following genes: а – NY-ESO1 ($p = 0.011$); б – MAGE A6 ($p = 0.012$); в – MAGE A12 ($p = 0.041$); г – SSX1 ($p = 0.0017$); д – PASD1 ($p = 0.0013$)

расчете БРВ у больных без экспрессии генов *MAGE A12* и *PASD1* медиана не достигнута.

Следующим этапом нашей работы стала оценка влияния экспрессии РТГ на клинические показатели (уровни лактатдегидрогеназы, лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина и бета-2-микроглобулина) у больных ММ. Некоторые клинические показатели продемонстрировали зави-

симость от экспрессии РТГ. Так, повышенный уровень креатинина наблюдается у пациентов с экспрессией генов *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12* и *SSX1*, повышенный уровень кальция – с экспрессией *MAGE A3* и *MAGE A12* (табл. 1). Показатели бета-2-микроглобулина практически в 2 раза выше у пациентов с экспрессией гена *MAGE A12*. Для других исследованных клинических параметров значимой зависимости

Таблица 1. Некоторые клинические показатели в зависимости от экспрессии раково-тестикулярных генов

Table 1. Selected clinical characteristics depending on the expression of cancer-testis genes

Экспрессия генов Gene expression	Кальций Calcium	<i>p</i>	Креатинин Creatinine	<i>p</i>	Бета-2-микроглобулин Beta-2-microglobulin	<i>p</i>
<i>MAGE A3</i> –	2,33 (1,82–2,51)	0,0329	70,0 (12,52–134,0)	0,0076	3,03 (1,37–7,38)	0,1133
<i>MAGE A3</i> +	2,53 (2,23–3,55)		108,5 (50–232)		4,39 (2,12–10,5)	
<i>MAGE A6</i> –	2,35 (1,8–2,9)	0,1608	73,5 (2,3–134,0)	0,0304	3,38 (1,37–7,38)	0,1789
<i>MAGE A6</i> +	2,53 (2,25–3,54)		116 (50–284)		8,97 (2,49–13,50)	
<i>MAGE A12</i> –	2,31 (1,82–2,51)	0,0235	71,0 (12,52–131,0)	0,0461	2,50 (1,37–6,75)	0,0261
<i>MAGE A12</i> +	2,48 (1,80–3,55)		89,5 (2,39–199,0)		4,39 (1,60–15,71)	
<i>SSX1</i> –	2,36 (2,05–2,63)	0,3438	71,0 (2,3–134,0)	0,0192	3,20 (1,37–7,38)	0,2339
<i>SSX1</i> +	2,49 (2,09–3,55)		88,5 (49,0–232,0)		3,58 (1,86–20,27)	

Таблица 2. Число больных с экспрессией раково-тестикулярных генов ($n = 77$), n (%)Table 2. The number of patients with expression of cancer-testis genes ($n = 77$), n (%)

Ген Gene	Первичные больные Primary patients	Больные, ранее получавшие терапию Patients who previously received therapy	Больные с прогрессированием/ рецидивом Patients with progression/ recurrence	Неустановленная группа больных Unspecified patient group
<i>PRAME</i>	33 (43)	10 (13)	5 (6,5)	5 (6,5)
<i>NY-ESO</i>	7 (9)	4 (5)	4 (5)	–
<i>GAGE</i>	29 (38)	10 (13)	5 (6,5)	–
<i>MAGE A3</i>	12 (16)	2 (3)	3 (4)	–
<i>MAGE A6</i>	6 (8)	1 (1)	3 (4)	–
<i>MAGE A12</i>	22 (29)	3 (4)	4 (5)	3 (4)
<i>SSX1</i>	10 (13)	1 (1)	5 (6,5)	1 (1)
<i>SLLP1</i>	36 (47)	13 (17)	3 (4)	4 (5)
<i>PASD1</i>	1 (1)	1 (1)	2 (3)	1 (1)

от экспрессии РТА не обнаружено ($p > 0,05$) (данные не представлены).

Показано, что у больных ММ в той или иной степени экспрессировались все исследуемые гены (табл. 2). Полученные результаты позволили показать важное прогностическое значение таких РТГ, как *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASD1*. Так, у больных ММ с экспрессией этих генов наблюдается развитие рецидива в более ранние сроки.

Обсуждение

Проведенное исследование посвящено изучению экспрессии РТГ у больных ММ, их влияния на клинические показатели, ОБ и БРВ.

Ранее продемонстрировано, что экспрессия генов семейства *MAGE*, *NY-ESO1*, *SSX1*, *PASD1* прямо коррелирует с более поздней стадией болезни, неблаго-

приятным прогнозом, более короткими сроками БРВ [29, 30]. Результаты, полученные нами, подтверждают эти данные. Так, медиана ОБ у больных ММ с экспрессией генов *NY-ESO1* ($p = 0,014$), *MAGE A6* ($p = 0,0004$), *MAGE A12* ($p = 0,04$) и *SSX1* ($p = 0,016$) значительно ниже, чем у пациентов, в клетках костного мозга которых отсутствует экспрессия этих генов. БРВ у больных ММ с экспрессией генов *NY-ESO1* ($p = 0,011$), *MAGE A6* ($p = 0,012$), *MAGE A12* ($p = 0,041$), *SSX1* ($p = 0,017$) и *PASD1* ($p = 0,0013$) значительно ниже, чем у пациентов, в образцах которых экспрессия отсутствовала. Однако в нашем исследовании зависимости между экспрессией РТГ и стадией болезни не обнаружено. Была определена зависимость экспрессии РТГ и того, к какой группе относится больной (первичный – 42/77, плановый – 22/77, прогрессирующий/рецидивирующий – 7/77). Анализ показал, что при прогрессировании/

рецидиве заболевания наблюдается повышенный уровень экспрессии генов *PRAME*, *MAGE A3*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASDI*. Важно отметить, что у больных, поступивших на последующий курс терапии, и первичных пациентов уровень экспрессии генов *MAGE A3*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASDI* равен или близок к нулю, в отличие от гена *PRAME*, экспрессия которого у первичных больных выше, чем у пациентов, получавших терапию ранее.

Для того чтобы оценить возможные прогностические факторы, мы провели анализ зависимости некоторых лабораторных показателей крови, которые были взяты из историй болезни пациентов с ММ (уровни лактатдегидрогеназы, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина, бета-2-микроглобулина). Установлено, что уровень кальция значительно выше у больных ММ с экспрессией генов *MAGE A3* ($p = 0,0329$) и *MAGE A12* ($p = 0,0235$), чем у пациентов без их экспрессии. При экспрессии генов *MAGE A3* ($p = 0,0076$), *MAGE A6* ($p = 0,0304$), *MAGE A12* ($p = 0,0461$), *SSX1* ($p = 0,0192$) показатели креатинина были как минимум в 2 раза выше, чем без экспрессии этих генов. Экспрессия гена *MAGE A12* ($p = 0,0261$) совпала с повышенным уровнем бета-2-микроглобулина. Известно, что одним из неблагоприятных факторов при ММ является высокий уровень бета-2-микроглобулина, а высокий уровень кальция указывает на более агрессивную фазу заболевания. Таким образом, можно предположить, что

действительно экспрессия генов *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12* и *SSX1* связана с неблагоприятным течением болезни. Также важно отметить, что экспрессия гена *MAGE A12* наблюдалась у больных, имеющих повышенное содержание кальция, креатинина и бета-2-микроглобулина в крови. Возможно, по этой причине экспрессия гена *MAGE A12* является основным маркером более развитого опухолевого процесса, агрессивного течения болезни.

Заключение

В нашей работе определены уровни экспрессии РТГ *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASDI*, их влияние на ОБ и скорость возникновения рецидива, влияние на некоторые биохимические показатели у больных ММ. Полученные результаты позволили обнаружить, что у больных ММ с экспрессией таких РТГ, как *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASDI*, наблюдается развитие рецидива в более ранние сроки. Показано, что медиана ОБ больных с экспрессией *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12* и *SSX1* значительно ниже, чем у пациентов, в клетках которых экспрессия этих генов отсутствует. Таким образом, экспрессия исследуемых РТГ имеет важное прогностическое значение для больных ММ и может быть использована, как тест-система для раннего выявления прогрессирования заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Scanlan M.J., Simpson A.J., Old L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immunol* 2004;4:1. PMID: 14738373.
- Chen Y.T., Scanlan M.J., Sahin U. et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(5):1914–8. PMID: 9050879.
- Scanlan M.J., Gure A.O., Jungbluth A.A. et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002;188:22–32. PMID: 12445278.
- Simpson A.J., Caballero O.L., Jungbluth A. et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):615–25. DOI: 10.1038/nrc1669. PMID: 16034368.
- Mirandola L., Cannon M.J., Cobos E. et al. Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. *Int Rev Immunol* 2011;30(2–3):127–37. DOI: 10.3109/08830185.2011.572504. PMID: 21557639.
- Мисюрин В.А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):3–9. [Misyurin V.A. X-chromosomal cancer-testis genes. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2014;13(2):3–9. (In Russ.)].
- Fratta E., Coral S., Covre A. et al. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol* 2011;5(2):164–82. DOI: 10.1016/j.molonc.2011.02.001. PMID: 21376678.
- Song M.H., Ha J.C., Lee S.M. et al. Identification of BCP-20 (FBXO39) as a cancer/testis antigen from colon cancer patients by SEREX. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408(2):195–201. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.077. PMID: 21338577.
- Chen Y.T., Ross D.S., Chiu R. et al. Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. *PLoS One* 2011;6(3):17876. DOI: 10.1371/journal.pone.0017876. PMID: 21437249.
- Boss D.S., Glen H., Beijnen J.H. et al. Serum β -HCG and CA-125 as tumor markers in a patient with osteosarcoma: case report. *Tumori* 2011;97(12):109–14. PMID: 21528673.
- Silina K., Zayakin P., Kalnina Z. et al. Sperm-associated antigens as targets for cancer immunotherapy: expression pattern and humoral immune response in cancer patients. *J Immunother* 2011;34(1):28–44. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181fb64fa. PMID: 21150711.
- Maruyama M., Yoshitake H.T.H., Takamori K., Araki Y. Molecular expression of Ly6k, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein on the mouse testicular germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402(1):75–81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.117. PMID: 20920470.
- Matsuda R., Enokida H., Chiyomaru T. et al. LY6K is a novel molecular target in bladder cancer on basis of integrate genome-wide profiling. *Br J Cancer* 2011;104(2):376–86. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605990. PMID: 21063397.
- Li F.Q., Liu Q., Han Y.L. et al. Sperm protein 17 is highly expressed in endometrial and cervical cancers. *BMC Cancer* 2010;10:429.

- DOI: 10.1186/1471-2407-10-429.
PMID: 20712874.
15. Demento S.L., Siefert A.L., Bandyopadhyay A. et al. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends Biotechnol* 2011;29(6):294–306. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.02.004. PMID: 21459467.
 16. Forghanifard M.M., Gholamin M., Farshchian M. et al. Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2011;12(3):191–7. PMID: 21613820.
 17. Gaugler B., van den Eynde B., van der Bruggen P. et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994;179(3):921–30. PMID: 8113684.
 18. Ng A.K. Diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Radiat Oncol* 2007;17(3):169–75. DOI: 10.1016/j.semradonc.2007.02.002. PMID: 17591563.
 19. Weigert O., Unterhalt M., Hiddemann W., Dreyling M. Current management of mantle cell lymphoma. *Drugs* 2007;67(12):1689–702. PMID: 17683170.
 20. Richardson P.G., Mitsiades C., Schlossman R. et al. New drugs for myeloma. *Oncologist* 2007;12(6):664–89. DOI: 10.1634/theoncologist.12-6-664. PMID: 17602058.
 21. Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999;10(12):1419–32. PMID: 10643532.
 22. Veelken H., Osterroth F. Vaccination strategies in the treatment of lymphomas. *Oncology* 2002;62(3):187–200. DOI: 10.1159/000059565. PMID: 12065865.
 23. Bogen B., Ruffini P.A., Corthay A. et al. Idiotype-specific immunotherapy in multiple myeloma: suggestions for future directions of research. *Haematologica* 2006;91(7):941–8. PMID: 16818282.
 24. Richardson P.G., Sonneveld P., Schuster M. et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 2007;110(10):3557–60. DOI: 10.1182/blood-2006-08-036947. PMID: 17690257.
 25. Engelhardt M., Udi J., Kleber M. et al. European myeloma network: the 3rd Trialist forum consensus statement from the European experts meeting on multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2010;51(11):2006–11. DOI: 10.3109/10428194.2010.516378. PMID: 20807087.
 26. Kono K., Mizukami Y., Daigo Y. et al. Vaccination with multiple peptides derived from novel cancer-testis antigens can induce specific T cell responses and clinical responses in advanced esophageal cancer. *Cancer Sci* 2009;100(8):1502–9.
 27. Barlogie B., Shaughnessy J., Tricot G. et al. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 2004;103(1):20–32. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1045. PMID: 12969978.
 28. Bakkus M.H., Bouko Y., Samson D. et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;126(5):665–74. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05120.x. PMID: 15327517.
 29. van Rhee F., Szmania S.M., Zhan F. et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 2005;105(10):3939–44. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3707. PMID: 15671442.
 30. van Duin M., Broy A., de Knecht Y. et al. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy. *Haematologica* 2011;96(11):1662–9. DOI: 10.3324/haematol.2010.037978. PMID: 21791470.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам ООО «ГеноТехнология» за оказанную помощь при выполнении данной работы.

Acknowledgment. Authors express thanks to GeneTechnology for the assistance in performing this study.

Вклад авторов

А.А. Солодовник, А.С. Мкртчян, А.В. Мисюрин: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи, утверждение рукописи;
В.А. Мисюрин: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи;

В.В. Тихонова, Ю.П. Финашутина, Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи;

О.М. Вотякова, О.Ю. Якимович, О.М. Володина, М.Ю. Кичигина, Е.Г. Медведовская, А.С. Антипова, И.З. Заводнова, А.А. Семенова, Г.Р. Аракелян, Ю.Е. Рябухина, О.А. Коломейцев: предоставление материалов исследования, утверждение рукописи;

А.Д. Ширин: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи, утверждение рукописи;

Е.А. Османов: концепция и дизайн исследования, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи, утверждение рукописи.

Authors' contributions

A.A. Solodovnik, H.S. Mkrtychyan, A.V. Misyurin: study concept and design, data accumulation and processing, provision of study materials data analysis and interpretation, article preparation, article approval;

V.A. Misyurin: study concept and design, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи;

V.V. Tikhonova, Yu.P. Finashutina, N.N. Kasatkina, O.N. Solopova: data accumulation and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article approval;

О.М. Votyakova, O.Yu. Yakimovich, O.M. Volodina, M.Yu. Kichigina, E.G. Medvedovskaya, A.S. Antipova, I.Z. Zavodnova, A.A. Semenova, G.R. Arakelyan, Yu.E. Ryabukhina, O.A. Kolomeytsev: provision of study materials, article approval; A.D. Shirin: data accumulation and processing, provision of study materials, article preparation, article approval; E.A. Osmanov: study concept and design, provision of study materials, article preparation, article approval.

ORCID авторов

A.A. Солодовник: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>
A.C. Мкртчян: <https://orcid.org/0000-0002-0638-213X>
B.A. Мисюрин: <http://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
B.V. Тихонова: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
Ю.П. Финашутина: <https://orcid.org/0000-0002-6154-535X>
Н.Н. Касаткина: <http://orcid.org/0000-0002-4735-977X>
О.Ю. Якимович: <https://orcid.org/0000-0002-4309-2473>
Е.Г. Медведовская: <https://orcid.org/0000-0001-9615-6090>
A.C. Антипова: <http://orcid.org/0000-0002-1731-8336>
И.З. Заводнова: <http://orcid.org/0000-0001-6674-8634>
O.A. Колomeйтцев: <https://orcid.org/0000-0003-3430-8540>
A.D. Ширин: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>
E.A. Османов: <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>
A.B. Мисюрин: <http://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

ORCID of authors

A.A. Solodovnik: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>
H.S. Mkrтчyan: <https://orcid.org/0000-0002-0638-213X>
V.A. Misyurin: <http://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
V.V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
Yu.P. Finashutina: <https://orcid.org/0000-0002-6154-535X>
N.N. Kasatkina: <http://orcid.org/0000-0002-4735-977X>
O.Yu. Yakimovich: <https://orcid.org/0000-0002-4309-2473>
E.G. Medvedovskaya: <https://orcid.org/0000-0001-9615-6090>
A.S. Antipova: <http://orcid.org/0000-0002-1731-8336>
I.Z. Zavodnova: <http://orcid.org/0000-0001-6674-8634>
O.A. Kolomeytsev: <https://orcid.org/0000-0003-3430-8540>
A.D. Shirin: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>
E.A. Osmanov: <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>
A.V. Misyurin: <http://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

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.

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: 18.04.2018. **Принята к публикации:** 25.05.2018

Article received: 18.04.2018. **Accepted for publication:** 25.05.2018