

Козлов Вадим Викторович

**КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО И ИХ
ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ У КУРЯЩИХ И
НЕКУРЯЩИХ ПАЦИЕНТОВ**

1.5.4 – биохимия

3.1.6 – онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Новосибирск - 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор Гуляева Людмила Федоровна
доктор медицинских наук, профессор Красильников Сергей Эдуардович

Официальные оппоненты:

Миронова Надежда Львовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Аллахвердиев Ариф Керим оглы, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом торакоабдоминальной хирургии государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова» департамента здравоохранения города Москвы

Топольницкий Евгений Богданович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий хирургическим торакальным отделением Областного государственного автономного учреждения здравоохранения «Томская областная клиническая больница»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита состоится « » октября 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте <http://frcftm.ru.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рак легкого – одна из часто диагностируемых злокачественных опухолей и основная причина смерти от рака во всем мире. По оценке GLOBOCAN (Global Cancer Statistics) смертность от рака легкого (РЛ) в мире занимает первое место в структуре всех злокачественных новообразований, что составляет 18 % (Жуйкова Л. Д. и др., 2020; Siegel R. L. et al., 2020; Sung H. et al., 2021). Наряду с этим смертность от РЛ в Новосибирской области (НСО) несколько превышает мировые показатели и составила в 2021 году 19,7 % (Каприна А. Д. и др., 2022).

Стандартный подход с использованием платиновых дуплетов для лечения метастатического РЛ не показал значимого прогресса на протяжении последних десятилетий, при этом общая выживаемость данной категории пациентов не превышает 8 месяцев (Leduc C. et al., 2005). Химиотерапия не является избирательной и в 50 % случаев проводится напрасно (Pimentel F. L. et al., 2006).

Интенсивное развитие современных молекулярно-генетических исследований в онкологии привело к открытию новых мишеней для диагностики и лечения. За последние 15–20 лет наиболее изучена в этом отношении аденокарцинома легкого, что послужило настоящим прорывом в таргетной терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Речь идет об открытии драйверных мутаций EGFR, ALK, ROS1, BRAF и др. Однако, встречаемость всех мутаций, обуславливающих назначение таргетной терапии для аденокарциномы легкого, не превышает 30 %, тогда как при плоскоклеточном раке легкого таких мутантных белков в качестве мишеней для лечения в настоящее время не найдено, за исключением использования ингибиторов контрольных точек иммунного ответа. Все это говорит о необходимости поиска новых маркеров рака легкого (Wu Y.-L. et al., 2017; Farago A. F. et al., 2017; Johnson M. et al., 2022).

Важной составляющей в развитии злокачественных опухолей и рака легкого, в частности, является состояние иммунной системы организма пациента. В идеальных условиях иммунокомпетентные клетки должны распознавать чужеродные опухолевые антигены и уничтожать их. Однако в реальной жизни злокачественные опухоли имеют разнообразные механизмы ускользания от иммунного надзора. Преодоление такой иммунной резистентности в настоящее время является одной из первоочередных задач клинической онкологии (Bonaventura P. et al., 2019; Saab S. et al., 2020).

Исследования последних лет показали, что наряду с генетическими факторами существенную роль в патогенезе НМРЛ играют эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК, реорганизация хроматина и регуляция экспрессии генов с помощью микроРНК (Chen Q. Y. et al., 2019). Современные исследования показали, что экспрессия генов меняется в различных подтипах НМРЛ, в том числе в зависимости от факторов окружающей среды, в частности под воздействием табачного дыма. Активация

арил-углеводородного рецептора (AhR) канцерогенным компонентом табачного дыма – бензо(а)пиреном (БП) – является одним из звеньев канцерогенеза легкого, однако изменение экспрессии AhR-зависимых генов-мишеней, включая микроРНК, остается недостаточно изученным. Поэтому изучение таких эпигенетических механизмов канцерогенеза может позволить идентифицировать новые маркеры прогноза и лечения рака легкого (Bock K. W. et al., 2019; Филиппов С. В. и др., 2020).

Кроме того, в научной литературе широко обсуждаются различные механизмы нарушения экспрессии генов-супрессоров и онкогенов, что играет важную роль в развитии разных типов рака, в том числе и рака легкого. Наибольший интерес в канцерогенезе легкого представляют гены *TP53*, *KRAS*, *PTEN*. Однако, несмотря на большое количество исследований в этом направлении, до сих пор в клинической практике не существует таргетных препаратов, нацеленных на такие мишени при лечении РЛ (Rekhtman N. et al., 2012; Wheler J.J. et al., 2016; Álvarez-García V. et al., 2019; Stading R. et al., 2021).

Современные исследования показали, что опухоли курящих и некурящих пациентов различаются по некоторым молекулярным маркерам. Так у курящих пациентов с НМРЛ регистрируется повышенная экспрессия PD-L1, что является показанием к проведению иммунотерапии (Alsaab H. O. et al., 2017; Wang G. Z. et al., 2019). Все это указывает на необходимость дальнейших исследований в этой области с целью улучшения результатов лечения рака легкого (Patel Y. M. et al., 2016; Ryu Y. S. et al., 2019).

Степень разработанности темы диссертации. В настоящее время рак легкого является одним из ведущих заболеваний с высокой смертностью – до 18 %. По данным сайта Интернационального Агентства Исследований Рака, в 2020 году абсолютное количество смертей в мире от этого заболевания составило 1,796 млн. человек, что обеспечивает РЛ абсолютное лидерство в структуре смертности злокачественных новообразований (Bade V. C. et al., 2020; Siegel R. L. et al., 2020; Sung H. et al., 2021). В большинстве случаев статистические базы оценки заболеваемости и смертности от РЛ учитывают возраст, пол, стадия, при этом не принимают во внимание гистологический тип опухоли, статус курения и сочетания этих клинических факторов (Мерабишвили В. М. и др., 2018; Duma N. et al., 2019; Bade V. C. et al., 2020; Каприн А. Д. и др., 2022). Разделение НМРЛ на аденокарциному легкого (АКЛ) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) в диагностике и лечении диктуется современным развитием исследований в этом направлении, так как известен факт, что ПКРЛ в большей степени связан с курением и отсутствием клинически значимых драйверных мутаций, тогда как АКЛ все чаще возникает у более молодых и некурящих женщин, а частота драйверных мутаций может достигать 30–40 % в зависимости от расы. Все это свидетельствует в пользу биологических различий этих двух типов НМРЛ, с разной степенью влияния фактора курения и, возможно, дифференциальных путей реализации канцерогенеза (Barta J. A. et al., 2019; Duma N. et al., 2019; Corrales L. et al.,

2020; Stapelfeld C. et al., 2020; Wang B. Y. et al., 2020; Sow M. L. et al., 2021). Важно отметить, что одним из путей снижения смертности от РЛ, является ранняя диагностика, которая может реализовываться за счет внедрения скрининговой НДКТ (низкодозовая компьютерная томография), однако такая методика может применяться только у определенной когорты населения и не является универсальной (Church T. R. et al., 2013; de Koning H. J. et al., 2020; Sadate A. et al., 2020). В такой ситуации необходимы новые пути решения этой проблемы, как с точки зрения ранней диагностики, так и поиска новых подходов в лечении. Одним из современных направлений в этой области является поиск новых молекулярных маркеров, которые отличались бы своей универсальностью и простотой применения (Rizvi N. A. et al., 2015; Rogers S. et al., 2017; Schweisgut J. et al., 2017; Iqbal M. A. et al., 2019; Wang G. Z. et al., 2019; Schoenfeld A.J. et al., 2020; Schoenfeld A. J. et al., 2021; Ding Z. et al., 2021; Takeuchi F. et al., 2022; Passaro A. et al., 2022). Решению обозначенной проблемы и посвящена тема настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования. Провести сравнительный клиничко-анамнестический анализ немелкоклеточного рака легкого и молекулярно-генетическое исследование опухолей для диагностики и лечения у курящих и некурящих пациентов.

Задачи исследования:

1. Провести клиничко-эпидемиологическое исследование распространенности немелкоклеточного рака легкого в Новосибирской области, а также выживаемости пациентов в зависимости от гистотипа, возраста, пола, стадии и курения.
2. Провести анализ частоты мутаций в гене *EGFR* у курящих и некурящих пациентов. Оценить возможности «жидкой» биопсии в оценке резистентности к тирозинкиназным ингибиторам.
3. Провести фенотипическую и функциональную характеристику разных подтипов дендритных клеток в периферической крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого по сравнению с условно-здоровыми людьми.
4. С применением биоинформатического анализа базы данных TCGA оценить экспрессию гена *AhR*, *AhR*-регулируемых генов *AhRR*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* и экспрессию *PTEN* в опухолях немелкоклеточного рака легкого в зависимости от статуса курения.
5. С помощью методов *in silico* найти микроРНК, потенциально регулируемые *AhR*, и оценить их экспрессию в опухолях легких курящих и некурящих пациентов с немелкоклеточным раком легкого.
6. Оценить экспрессию *AhR*, *AhR*-зависимых генов *CYP1A1*, *PD-L1*, микроРНК и экспрессию *PTEN* в опухолях легких курящих и некурящих пациентов.

7. Изучить гендерные особенности экспрессии ключевых генов-мишеней AhR (*CYP1A1*, микроРНК) и экспрессии *PTEN* в легких на моделях экспериментальных животных при хроническом и остром воздействии бензо(а)пирена – компонента сигаретного дыма.

Научная новизна. В работе впервые проведен обширный эпидемиологический анализ зависимости выживаемости пациентов с НМРЛ от клинических параметров, что позволило выявить различия не только от стадии, гистотипа, пола и возраста, но и от статуса курения. На моделях экспериментальных животных впервые показано изменение экспрессии AhR-регулируемых генов (*CYP1A1*, *CYP1B1*, микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р) и их генов-мишеней (*PTEN*, *EMP2*, *IGF1*, *SLC34A2*) в легких в зависимости от гендерного фактора, как при однократном, так и при хроническом воздействии бензо(а)пирена. С помощью анализа базы данных TCGA методами *in silico* нами впервые выявлены новые AhR-зависимые микроРНК в опухолях пациентов с АКЛ и ПКРЛ и изучено изменение их экспрессии в зависимости от статуса курения. Впервые была исследована ассоциация экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181а, -155, -146а со статусом PD-L1 в опухолевых образцах НМРЛ. Изучены изменения уровня экспрессии генов-мишеней, исследуемых микроРНК, в частности, экспрессия *PTEN*, что позволило рассматривать его, как потенциальный маркер для терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты важны как для фундаментальной науки, так и для клинической онкологии. С практической точки зрения, полученные результаты масштабного эпидемиологического исследования позволяют оценивать прогноз у пациентов с НМРЛ в зависимости от клинических параметров (пол, гистотип, статус курения). Оценка частоты мутации *EGFR* у курящих и некурящих пациентов в зависимости от пола и использования интервальной оценки, циркулирующей ДНК плазмы у пациентов с этой мутацией, получающих лечение ингибиторами тирозинкиназы, позволяют персонализировать подходы к таргетной терапии рака легкого и повысить частоту выявления ранней резистентности к такому лечению.

Теоретическая значимость заключается в выявлении AhR-регулируемых генов в опухолях курящих и некурящих пациентов с НМРЛ, таких как микроРНК, *PD-L1*, а также микроРНК регулируемого гена *PTEN*. Полученные данные по изменению экспрессии этих генов под воздействием курения через активацию AhR важны для нашего понимания начального этапа канцерогенеза легких. Выявленные молекулярные маркеры (микроРНК, *PTEN*) могут быть использованы как в диагностических целях для определения прогноза ответа на лечение, так и выступать в качестве привлекательной терапевтической модели. Полученные результаты открывают новые возможности в изучении механизмов канцерогенеза легкого через активацию AhR-зависимых сигнальных путей, конечными мишенями которых являются PD-L1, микроРНК и их гены-мишени.

Методология и методы диссертационного исследования.

Диссертационная работа концептуально представлена двумя частями. Первая часть клиническая, которая включала в себя комплексную эпидемиологическую оценку НМРЛ в Новосибирской области, биоинформатический анализ данных TCGA, позволяющих оценить экспрессию *AhR*, *AhRR*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *PD-L1*, *AhR*-зависимых и *PTEN*-регулирующих микроРНК, экспрессию *PTEN*, а также исследование экспрессии *AhR*, *AhR*-зависимых, *PD-L1* и *PTEN*-регулирующих микроРНК, экспрессии *PTEN* и *PD-L1* в 120 парных клинических опухолевых образцах легких курящих и некурящих пациентов с НМРЛ в сравнении с условно-нормальной тканью легкого. В эпидемиологическое исследование было включено 6 056 пациентов с НМРЛ, которые зарегистрированы в ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер» в период 2015–2019 гг. В этой когорте пациентов произведен анализ выживаемости в зависимости от стадии заболевания, возраста, пола и гистологического типа опухоли. Для оценки влияния фактора курения на прогноз и выживаемость произведена оценка 1 354 пациентов (ПКРЛ – 648 случаев и АКЛ – 706 случаев). Отдельно изучалась распространенность мутации в гене *EGFR* в НСО за период 2013–2017 гг. у 549 пациентов. Кроме того, у 36 пациентов с АКЛ и наличием мутации в гене *EGFR*, получавших тирозинкиназные ингибиторы, оценивалась возможность жидкой биопсии и ранней диагностики рецидива. В рамках этого анализа продемонстрировано два клинических случая. Для оценки потенциального использования дендритных клеток в иммунотерапии НМРЛ произведена фенотипическая и функциональная характеристика их подтипов в периферической крови 20 пациентов.

Вторая часть экспериментальная, в этом разделе произведен эксперимент на 56 половозрелых крысах (28 самцов, 28 самок) линии Вистар. Крысам внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл раствора бензо(а)пирена («Sigma-Aldrich», США) в подсолнечном масле (однократное введение или хроническое введение) для изучения гендерных особенностей эффекта бензо(а)пирена на экспрессию *AhR*, *AhR*-зависимых микроРНК и их генов-мишеней (*PTEN*, *EMP2*, *IGF1*, *SLC34A2*) в легких.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ MS Office, STATISTICA (версия 12) и Origin. Исследование выживаемости осуществлялось методом множительных оценок Каплана – Мейера. Для оценки достоверности различий между выборками использовался t-критерий Стьюдента. Для изучения влияния определенного фактора на медиану выживаемости в подгруппах использовали непараметрические критерии: логарифмический ранговый, обобщенный Геханом критерий Уилкоксона, многовыборочный критерий Хи-квадрат с процедурой Менделя для сравнения времени жизни. Для сравнения выборок по выживаемости, категоризованных в соответствии с изучаемым фактором, также применялся обобщенный критерий Уилкоксона – Гехана. Для проверки гипотез о достоверности различий использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Различия считали

статистически значимыми при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту:

1. Медиана выживаемости пациентов с плоскоклеточным раком легкого составляет 14,5 месяцев, для аденокарциномы легкого – 18 месяцев. Выживаемость пациентов с немелкоклеточным раком легкого зависит не только от стадии, гистотипа, но и от курения: курение ухудшает медиану выживаемости у пациентов как с плоскоклеточным раком легкого, так и с аденокарциномой легкого.
2. Частота мутаций (Del19, L858R) в гене *EGFR* в опухолях пациентов с аденокарциномой легкого зависит от курения и от пола пациента. Определение таких мутаций с помощью «жидкой» биопсии позволяет выявить доклинический рецидив заболевания.
3. Курение вызывает изменения в экспрессии *AhR*, его генов-мишеней *CYP1A1*, *PD-L1* и *AhR*-регулируемых микроРНК в опухолях пациентов с немелкоклеточным раком легкого.
4. Уровень экспрессии *AhR*-регулируемых, *PD-L1* и *PTEN*-регулирующих микроРНК-301a, -93, -155, -181a, -21 различается у курящих и некурящих пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Изменение экспрессии *PTEN* позволяет рассматривать его как перспективную терапевтическую мишень.
5. Изменение экспрессии *AhR*, его генов-мишеней *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* и экспрессии *PTEN* при хроническом введении бензо(а)пирена, компонента сигаретного дыма, крысам, зависит от пола.

Степень достоверности результатов. Достоверность проведенного исследования подтверждается масштабной выборкой пациентов для эпидемиологического анализа (6 056 пациентов с НМРЛ за период 5 лет и 1 354 пациента для оценки влияния курения на выживаемость). Была создана репрезентативная коллекция биообразцов для молекулярно-генетических исследований в ходе радикальных хирургических вмешательств (120 пар образцов опухоли и условно-нормальная ткань легкого у пациентов с НМРЛ). В экспериментах на животных использовалось 56 половозрелых крыс Вистар (28 самцов, 28 самок) массой 150–180 г, приобретенных в питомнике Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Молекулярные, иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные исследования проводились на современном оборудовании с использованием стандартных методик и программ. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ MS Office, STATISTICA (версия 12) и Origin. Исследование выживаемости осуществлялось методом множительных оценок Каплана – Мейера. Для оценки достоверности различий между выборками использовался t-критерий Стьюдента. Для сравнения выборок по выживаемости, категоризованных в соответствии с изучаемым фактором применялся обобщенный критерий Уилкоксона – Гехана. Результаты, полученные на

образцах опухолей человека, рассчитывали по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: 9-й отчетной научной сессии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (Новосибирск, 2016); 8-й Российской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2017» (Новосибирск, 2017); Международной студенческой экологической конференции (МЭСК) (Новосибирск, 2018); 4-й Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2018); 9-й Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2018» (Новосибирск, 2018); 24-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Лабораторная служба в современных условиях» (Москва, 2019); 2-й Всероссийской конференции с международным участием «Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 2019); 12th International ISSX Meeting (Portland, Oregon, USA, 2019); 33rd Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research (Stintino, Sardinia, Italy, 2019); панельной дискуссии «От общего к частному: ведение пациентов с НМРЛ I–III стадии. Перспектива» (Новосибирск, 2022); Междисциплинарном онлайн-семинаре «Новые подходы в диагностике и лечении рака легких» (Новосибирск, 2022); Poster presented at the European Lung Cancer Virtual Congress (ELCC) (Lugano, Switzerland, 2022); Саммите по торакальной онкологии (Москва, 2022); Научно-практической конференции «Ветер перемен в терапии рака легкого» (Красноярск, 2022); заседании краевого онкологического общества (Красноярск, 2022); 2-ом Национальном онкопульмонологическом конгрессе (Москва, 2022); Российской научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты и перспективы мультидисциплинарного подхода в лечении ЗНО различных локализаций» (Барнаул, 2022); научно-практической конференции «Опухолевые маркеры. Фундаментальные и клинические аспекты» (с. Майма, Республика Алтай, 2022); 30-ом конгрессе всемирного общества сердечно-сосудистых и торакальных хирургов и 11-м Международном конгрессе «Актуальные направления современной кардио-торакальной хирургии» (Санкт-Петербург, 2022); 8-й Всероссийской конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2022).

Апробация диссертации состоялась на научной конференции на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск, 2023).

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00065 «Поиск новых мишеней для диагностики и терапии плоскоклеточного рака легких».

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в практическую работу онкологического отделения № 3 (торакальной

онкологии) ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер» для диагностики и выработки оптимальной тактики лечения пациентов с НМРЛ (акт внедрения от 17.04.2023), также результаты исследования внедрены в практическую работу отделения онкологии и используются в научно-исследовательской работе научно-исследовательского отдела онкологии и радиотерапии института онкологии и нейрохирургии на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е. Н. Мешалкина» Минздрава России (акт внедрения от 30.03.2023). Результаты исследования используются в курсе лекций «Молекулярные основы патологических процессов» для студентов Института медицины и психологии В. Зельмана ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 2 патента на изобретение и 12 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, из них 6 статей в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Web of Science, Scopus).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 280 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, включающих обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Список литературы представлен 383 источниками, из которых 365 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 50 таблиц и 71 рисунка.

Личный вклад автора. При выполнении работы автор лично принимал участия в наборе клинического материала, осуществлял отбор пациентов в соответствии с поставленными задачами, производил забор опухолевых образцов, их консервацию, осуществлял разработку и наполнение электронной базы, лично выполнял операции у большинства включенных в исследование пациентов. Кроме того, автор самостоятельно провел анализ научной литературы, участвовал в постановке молекулярно-генетических экспериментов, производил интерпретацию полученных результатов, а также проводил подготовку и публикацию основных научных статей и патентов; осуществлял написание глав и оформление диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинический материал для эпидемиологического анализа. В исследование вошли пациенты с установленными диагнозами ПКРЛ и АКЛ, подтвержденными гистологическими заключениями и задокументированными в медицинской отчетности. Размер выборки предварительно не рассчитывался. Данные отобраны сплошным методом за 2015–2019 гг. всех пациентов ГБУЗ НСО «НОКОД» с диагнозом ПКРЛ – 3 007 случаев, и с АКЛ – 3 049 случаев.

Клинический материал для анализа распространенности мутации EGFR. Для определения распространенности мутации в гене *EGFR* при раке легкого были собраны данные о пациентах, оперированных в ГБУЗ НСО «НОКОД» в период 2013–2017 гг. Всего было включено 549 пациентов, из них мужчин – 352, женщин – 197.

Образцы опухолевой и условно-нормальной ткани легкого для определения экспрессии AhR, CYP1A1, микроРНК, PTEN, PD-L1. В условиях ГБУЗ НСО «НОКОД» производился забор операционного материала в ходе выполнения радикального хирургического вмешательства на легком у больных с установленным диагнозом НМРЛ I–III стадии. Осуществлен забор парных образцов ткани легкого (опухолевой и условно-нормальной) в период с 2014 по 2022 годы. В общей сложности анализу подверглось 120 биообразцов (40 образцов ПКРЛ курильщики, 40 образцов АКЛ курильщиков и 40 образцов АКЛ никогда не куривших пациентов).

Клинический материал для характеристики дендритных клеток. В работе использовалась гепаринизированная периферическая венозная кровь, которая бралась от условно здоровых доноров (10 человек) и больных с гистологически подтвержденным диагнозом НМРЛ (20 человек) со стадиями ПА, ПВ, ПШ, а также операционный опухолевый материал от больных с НМРЛ, полученный в ГБУЗ НСО «НОКОД».

Животные. В работе использовали 56 половозрелых крыс (28 самцов, 28 самок) линии Вистар массой 150–180 г, приобретенных в питомнике Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия).

Для определения уровней мРНК выбранных генов проводили обратную транскрипцию с использованием 1 мкг выделенной тотальной РНК. Реакцию проводили с использованием набора ОТ-М-MuLV-RN (ООО «Биолабмикс») с использованием олиго(dT) и случайных гексануклеотидных праймеров. ПЦР для полученной кДНК проводили в режиме реального времени с использованием набора реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (ООО «Биолабмикс») в объеме 20 мкл. В каждую реакцию было взято 0,25 мкл кДНК. Анализ проводили на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) в следующих условиях: первичная денатурация 95 °С в течение 5 минут; затем 40 циклов: 95 °С – 15 с, 58–61 °С – 20 с, 72 °С – 20 с; построение кривой плавления. Реакции выполнялись в трех повторах. В качестве генов сравнения в эксперименте на крысах использовали *Actb* и *Hprt1*.

При исследовании экспрессии генов в опухолевом материале в качестве генов сравнения использовали *POLR2A* и *GAPDH*. Праймеры были подобраны с помощью ресурса PRIMER BLAST. Для определения экспрессии микроРНК сначала проводили обратную транскрипцию с использованием обратной транскриптазы M-MuLV-RH (ООО «Биолабмикс», Россия) и «stem-loop» праймеров, которые были специфичны для соответствующих последовательностей, выбранных микроРНК, полученных из miRBase. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, с применением технологии TaqMan (краситель R6G, тушителъ VHQ1) и набора БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) (ООО «Биолабмикс») в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ проводили на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR DetectionSystem (Bio-RadLaboratories) с использованием следующих условий: первичная денатурация 94 °С в течение 5 минут; затем 40 циклов: 94 °С – 15 с, 61 °С – 20 с, 72 °С – 30 с. Реакции выполнялись в трех повторах. В качестве генов сравнения в эксперименте *in vivo* использовались малые ядерные РНК U6 и U87. При оценке экспрессии микроРНК в опухолевых тканях человека в качестве генов сравнения использовали U44 и U48.

Определение относительного количества миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток, а также оценка их фенотипа проводилась в цельной периферической крови больных НМРЛ и условно здоровых доноров. Исследование проводилось с помощью меченых моноклональных антител методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACS Verse («BD Bioscience», США). Для оценки способности к созреванию и миграционного потенциала дендритные клетки обеих субпопуляций анализировали по экспрессии маркеров CD83, CD86, CCR7 («BD Bioscience», США) как до, так и после стимуляции созревания агонистами специфических Toll-подобных рецепторов (TLR) R848 (20 нг/мл) (Resiquimod «BioVision», США) и LPS (25 нг/мл) (*E. coli* 0114:B4 «Sigma», США).

Для отбора Ah-регулируемых микроРНК и их генов-мишеней использовались различные базы данных: пакет R Bioconductor, The Human Protein Atlas (URL: <https://www.proteinatlas.org>); TargetScan; ChIP-seq анализа; CHEA Transcription Factor Targets, Harmonizome (URL: <https://maayanlab.cloud/Harmonizome>). Биоинформатический анализ проведен с использованием набора геномных данных, выложенных в открытом доступе UALCAN (URL: <http://ualcan.path.uab.edu>) (Chandrashekar D. S. et al., 2017; Chandrashekar D. S. et al., 2022).

Статистическая обработка результатов ПЦР проводилась с помощью программ MS Office, STATISTICA (версия 12) и Origin. Для оценки достоверности различий между выборками использовался t-критерий Стьюдента. Результаты, полученные на образцах опухолей человека, рассчитывали по критерию Манна – Уитни. Для проверки наличия корреляции между уровнями экспрессии микроРНК и PTEN рассчитывался коэффициент корреляции Спирмена. При эпидемиологическом анализе обработка данных проводилась в электронных таблицах. Статистическую обработку

осуществляли с использованием пакета анализа данных StatSoft, Inc. (2007) и STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. Исследование выживаемости осуществлялось методом множительных оценок Каплана – Мейера. Для изучения влияния определенного фактора на медиану выживаемости в подгруппах были использованы непараметрические критерии: логарифмический ранговый, обобщенный Геханом критерий Уилкоксона, многовыборочный критерий хи-квадрат с процедурой Ментеля для сравнения времен жизни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияние разных факторов на выживаемость у пациентов с немелкоклеточным раком легкого Новосибирской области. Для анализа выживаемости пациентов с РЛ в НСО проанализировали 6 056 случаев заболевания, из них 4 758 мужчин и 1 298 женщин. Отмечен общий для ПКРЛ и АКЛ экспоненциальный вид функции выживаемости, характеризующий низкую пятилетнюю выживаемость (19,06 % и 18,48 % соответственно) (рис. 1а).

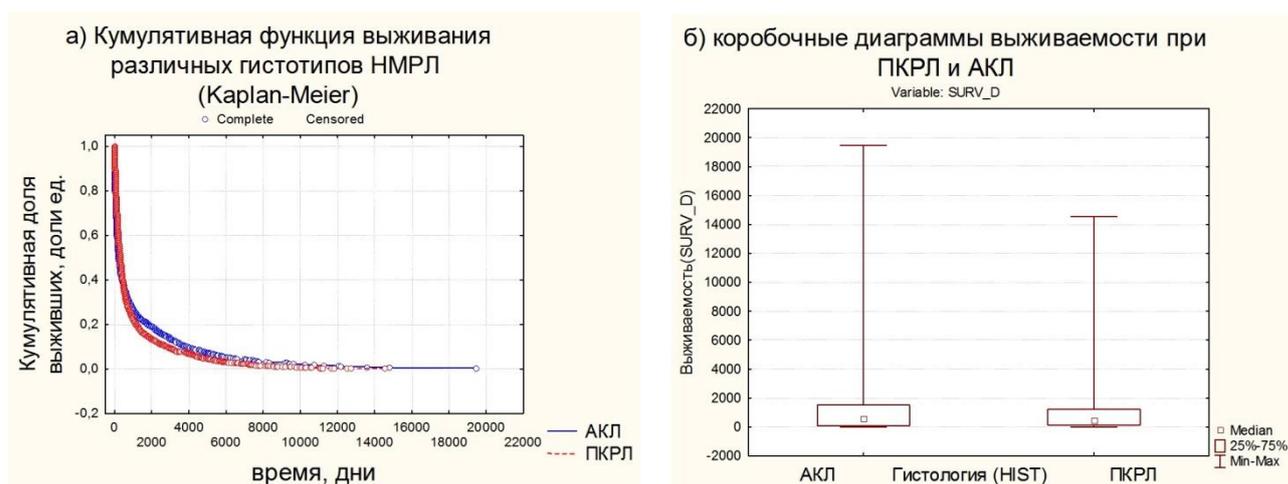


Рисунок 1 – Влияние гистотипа на выживаемость пациентов с немелкоклеточным раком легкого: а) – сравнение графиков функции выживания при плоскоклеточном раке легкого и аденокарциноме легкого; б) – различие в коробочных диаграммах для плоскоклеточного рака легкого и аденокарциномы легкого: медиана, 25 % и 75 % перцентили, размах

Для пациентов с ПКРЛ медиана выживаемости составила 14,5 месяца. Для больных с АКЛ медиана выживаемости оказалась немного выше 18 месяцев (рис. 1б).

Рассматривая анализ выживаемости по половой принадлежности, мы выявили неоднозначное распределение влияния данного фактора для пациентов с ПКРЛ и АКЛ. Для ПКРЛ достоверно значимого влияния гендерного фактора на медиану выживаемости не выявилось. В то же время для выборки пациентов

с АКЛ, медиана выживаемости у женщин была в 2,01 раза выше, чем таковая у мужчин (табл. 1).

Таблица 1 – Медиана выживаемости пациентов при аденокарциноме легкого, сгруппированных по гендерной принадлежности за период 2015–2019 гг.

Для пациентов с АКЛ (проверка критерием Logrank WW = 160,18; Sum = 2 762,2; Var = 585,50; Test statistic = 6,619723, p = 0,000001)	
гендерный признак	медиана выживаемости, дни
мужчины	370,0
женщины	747,0

Мы подтвердили международные данные о связи курения с гистотипом; так среди пациентов с ПКРЛ курильщиков было 87,89 %, а среди АКЛ – 64,02 %. Надо отметить, что длительный анамнез курения ухудшал выживаемость у пациентов с ПКРЛ в 1,92 раза, а с АКЛ – в 1,32 раза (рис. 2).

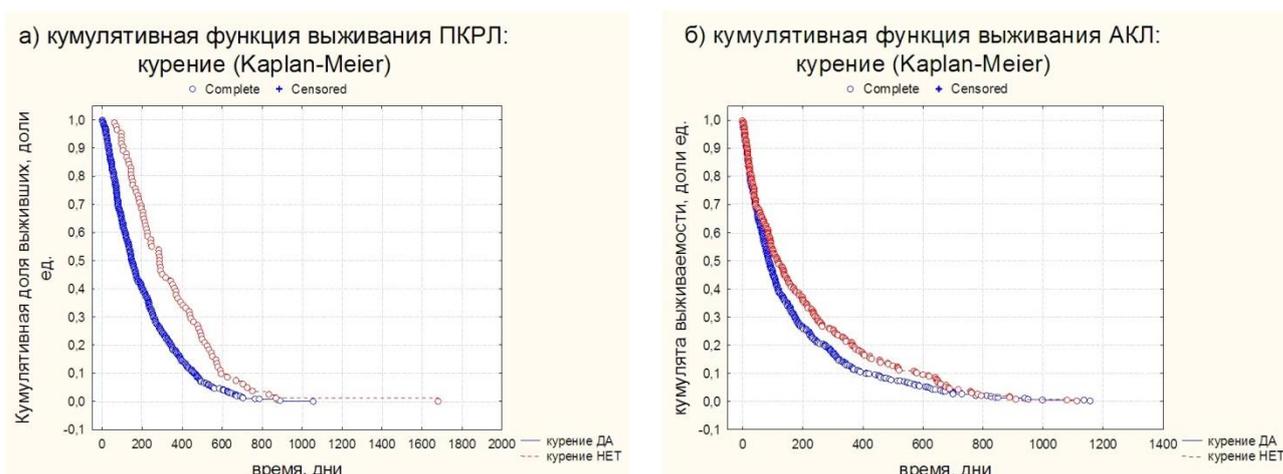


Рисунок 2 – Графики выживаемости в зависимости от статуса курения. а) – различия графиков функции выживаемости при плоскоклеточном раке легкого в зависимости от фактора курения, вычисленных по данным выборки 2017–2019 гг. (648 наблюдений); б) – различия графиков функции выживаемости при аденокарциноме легкого в зависимости от фактора курения, вычисленных по данным выборки 2017–2019 гг. (706 наблюдений)

Длительное курение приводило к более раннему возникновению РЛ по сравнению с не курильщиками: ПКРЛ возникает раньше в среднем на 4,03 года, а АКЛ – на 5,29 года.

Анализ соматических мутаций в гене *EGFR* у курящих и некурящих пациентов с аденокарциномой легкого. В нашей работе мы изучили частоту мутации *EGFR* у 549 пациентов и распределение ее в зависимости от пола и

статуса курения (табл. 2). Данный анализ показал, что мутация *EGFR* наиболее часто встречалась у некурящих женщин – в 35,5 % случаев, тогда как у некурящих мужчин этот показатель составил всего 6 %. Интересно, что у курящих женщин данная мутации не выявлялась вообще, а у курящих мужчин встречалась в 2,6 % случаев. Эти данные в целом сопоставимы с международными исследованиями у данной категории пациентов (Tseng J. S. et al., 2015).

Таблица 2 – Данные о наличии мутации в гене *EGFR* в зависимости от пола больных, морфологического варианта рака легкого и курения (%)

Статус курения	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	Крупноклеточный
Мужчины			
Курящие с <i>EGFR</i>	9 (2,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Не курящие с <i>EGFR</i>	21 (6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Курил ранее с <i>EGFR</i>	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Женщины			
Курящие с <i>EGFR</i>	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Не курящие с <i>EGFR</i>	70 (35,5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Курил ранее с <i>EGFR</i>	2(1 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Возможности «жидкой» биопсии в оценке резистентности к тирозинкиназным ингибиторам при *EGFR* мутированном немелкоклеточном раке легкого. Одним из подходов к раннему выявлению резистентности к терапии ИТК, является «жидкая» биопсия, т. е. интервальный забор плазмы крови для оценки титра первичной мутации в гене *EGFR* или выявление новых мутаций резистентности T790M или C797S в циркулирующей внеклеточной ДНК (Bollinger M. K. et al., 2018; Rolfo C. et al., 2018; Kock R. et al., 2021). Такой интервальный анализ первичной мутации был проведен в нашей работе на группе из 16 пациентов, которые получали ИТК первого поколения. В большинстве случаев нашего наблюдения мутация *EGFR* наблюдалась в циркулирующей ДНК до лечения, после начала лечения ИТК она не определялась в плазме, однако на определенном этапе лечения начинала детектироваться вновь. Надо отметить, что во всех случаях, повторное выявление мутации в циркулирующей ДНК на фоне лечения за несколько месяцев предшествовало клиническому прогрессированию болезни, в одном случае прогрессирование было обусловлено выявлением в плазме мутации резистентности T790M.

Дендритные клетки в индукции противоопухолевого клеточного ответа. Ключевая роль в индукции противоопухолевого клеточного ответа принадлежит антиген-презентирующим клеткам, в том числе дендритным клеткам (ДК), являющимися одними из основных регуляторов иммунных реакций в организме (Guermontprez P. et al., 2019). У больных НМРЛ наблюдалось достоверно меньшее содержание как миелоидных ДК (мДК), так и плазмоцитоидных ДК (пДК) по сравнению со здоровыми донорами, указывающее на истощение общего пула циркулирующих дендритных клеток в организме человека при НМРЛ. По экспрессии на поверхности ДК ко-стимулирующих молекул CD86 (на ранних стадиях созревания) и CD83 (на поздних стадиях созревания) оценивалась функциональная активность ДК. В пробах крови без стимуляции экспрессия CD86 на мДК и на пДК у больных НМРЛ была достоверно ниже, чем у здоровых доноров. В ответ на стимуляцию R848 и LPS в исследуемых группах наблюдалось достоверное увеличение количества клеток, экспрессирующих CD86 на мДК и пДК. При этом в популяции пДК у больных НМРЛ количество клеток, несущих маркер CD86 после стимуляции, было достоверно ниже, чем у здоровых доноров (рис. 3).

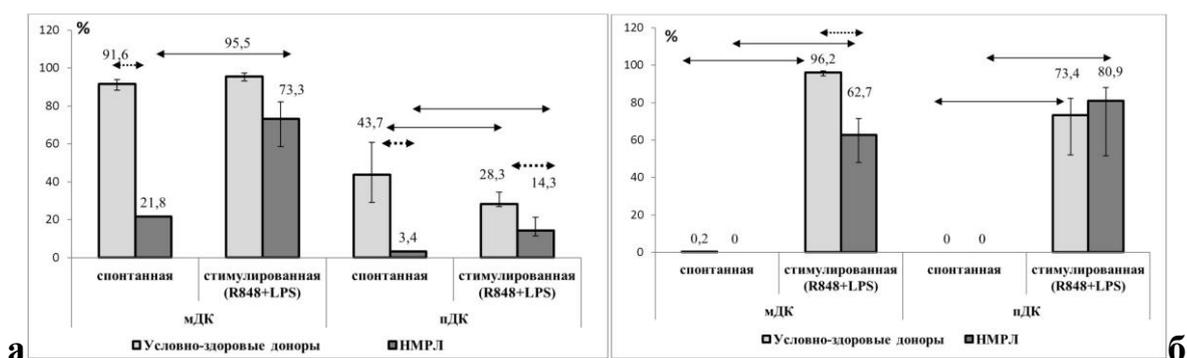
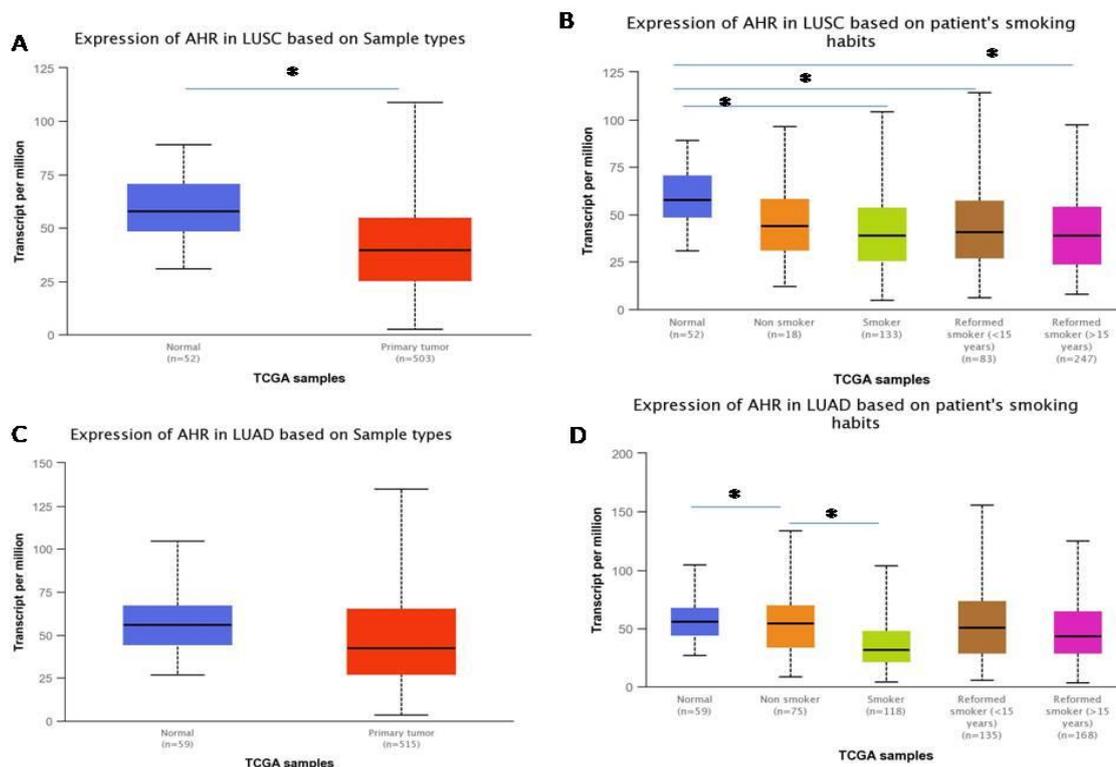


Рисунок 3 – а) – Относительное количество миелоидных дендритных клеток и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CD86 среди $lin^-/CD45^+/BDCA^+$ клеток; б) – Относительное количество миелоидных дендритных клеток и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CD83 среди $lin^-/CD45+/BDCA^+$ клеток (здоровые доноры $n = 10$, больные НМРЛ $n = 10$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при $p < 0,05$, критерий Wilcoxon

Биоинформатический анализ. Для изучения вклада курения в патогенез РЛ на молекулярном уровне нами был проведен биоинформатический анализ (БИ) AhR-регулируемых генов. Так как одним из лигандов для AhR является бензо(а)пирен (основной канцероген табачного дыма), то этот механизм активации AhR с последующим изменением регуляции его генов-мишеней является современным направлением изучения процесса канцерогенеза РЛ. Биоинформатический анализ экспрессии *AhR* в опухолевой ткани НМРЛ показал, что экспрессия этого рецептора снижена в опухолевой ткани как АКЛ,

так и ПКРЛ по сравнению с нормальной тканью, при этом статус курения влиял на экспрессию *AhR* только у пациентов с АКЛ, снижая ее, и не влиял у пациентов с ПКРЛ (рис. 4).



Примечание: * – $p < 0,05$ (LUSC – плоскоклеточный рак легкого; LUAD – аденокарцинома легкого).

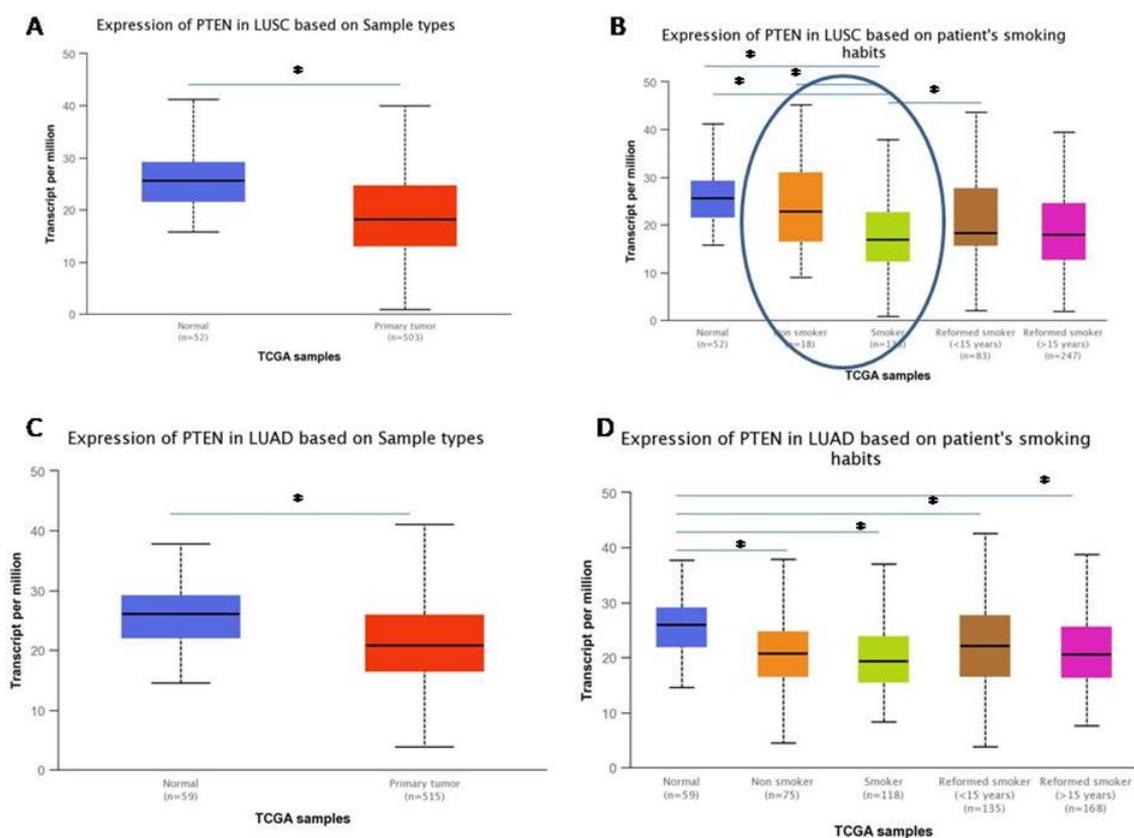
Рисунок 4 – Уровень экспрессии гена *AhR* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого (А) и аденокарциномы легкого (С) и в зависимости от статуса курения в образцах плоскоклеточного рака легкого (В) и аденокарциномы легкого (D)

С использованием базы UALCAN мы исследовали изменение уровней экспрессии классических генов-мишеней *AhR*, таких как *CYP1A1*, *CYP1A2* и *CYP1B1*, в опухолевых тканях НМРЛ по сравнению с нормой в зависимости от статуса курения. Полученные результаты продемонстрировали достоверное снижение уровня экспрессии классических генов мишеней *AhR* как в тканях ПКРЛ, так и в АКЛ по сравнению с нормой. При этом статус курения не оказал значимого влияния на этот показатель.

Экспрессия гена *CD274* была достоверно снижена (почти в 3 раза) в опухолевых тканях ПКРЛ и АКЛ по сравнению с нормальной тканью (контрольная группа). Однако при делении образцов с учетом статуса курения, достоверных результатов получено не было.

Анализ экспрессии гена *PTEN* показал, что его уровень снижается в опухолевых тканях как пациентов с ПКРЛ, так и пациентов с АКЛ (рис. 5 А,С).

Однако при распределении образцов по статусу курения пациентов было обнаружено, что курение вызывает достоверное снижение уровня мРНК *PTEN* только у пациентов ПКРЛ (рис. 5 В). В опухолевых тканях АКЛ курение не оказывало достоверного влияния на экспрессию гена *PTEN* (рис. 5 D).



Примечание: * – $p < 0,05$ (LUSC – ПКРЛ; LUAD – АКЛ).

Рисунок 5 – Уровень экспрессии гена *PTEN* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого (А) и аденокарциномы легкого (С) в зависимости от статуса курения пациента в образцах плоскоклеточного рака легкого (В) и аденокарциномы легкого (D)

Для поиска микроРНК, потенциально регулируемых AhR, использовалась информация о положениях DRE в геноме человека из данных ChIP-seq анализа и сравнивались координаты DRE с координатами предполагаемых промоторных областей микроРНК (Lo R. et al., 2012). Предполагаемые промоторные области были извлечены из генома человека (hg38) в 10 000 нт от начала последовательности микроРНК-предшественника (согласно miRGeneDB). В исследование были взяты микроРНК в промоторных областях которых содержится сайт связывания AhR согласно данным CHEA Transcription Factor Targets, представленных на ресурсе Harmonizome (URL: <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>). В результате такого поиска были отобраны AhR-регулируемые микроРНК-21, -93, -342, -146a, -181a.

Дополнительный анализ данных литературы позволил выбрать микроРНК, мишенью которых является PD-L1. К ним относятся AhR-регулируемые микроРНК-181а, -146а и PD-L1-регулирующая микроРНК-155 (Mastroianni J. et al., 2019; Peng L. et al., 2019). Далее, *in silico* анализ с помощью TargetScan позволил нам идентифицировать набор микроРНК, нацеленных на PTEN. Наибольший интерес у нас вызвала микроРНК-301а-3р, поскольку у нее значение context++ score percentile составляет 90 %.

Характеристика опухолевых образцов пациентов с немелкоклеточным раком легкого по уровню экспрессии AhR, CYP1A1, AhR-регулируемых микроРНК в зависимости от статуса курения и PD-L1. На нашей выборке опухолевых образцов пациентов курильщиков с ПКРЛ и АКЛ была получена разнонаправленная картина уровня экспрессии AhR. У пациентов с ПКРЛ она имела тенденцию к увеличению в 1,5 раза, а для курильщиков с АКЛ тенденцию к снижению в 1,5 раза, что может говорить о нескольких механизмах активации этого рецептора и дифференцированной роли курения в канцерогенезе разных гистологических типов рака легкого (Shivanna V. et al., 2022) (табл. 3).

Таблица 3 – Относительные уровни мРНК AhR в образцах тканей пациентов с немелкоклеточным раком легкого в зависимости от подтипа и статуса курения

Н (число пациентов)	мРНК AhR*	p-value
Плоскоклеточный рак легкого (курильщики)		
40	1,52 (0,03–13,99)	0,583
Аденокарцинома (курильщики)		
40	0,67 (0,13–22,44)	0,405
Аденокарцинома (некурящие)		
40	0,97 (0,02–5,46)	0,545
Примечание: * – медиана и диапазон относительного изменения уровней мРНК в опухоли легкого по сравнению с условно-нормальной тканью.		

Для пациентов с АКЛ была характерна взаимосвязь статуса курения с экспрессией CYP1A1: экспрессия была зарегистрирована для пациентов курильщиков, что подтверждается исследованиями других авторов (Stading R. et al., 2021). У пациентов с ПКРЛ такой зависимости выявлено не было, однако уровень экспрессии AhR был повышен у пациентов с экспрессией CYP1A1 в опухоли. Эти результаты были получены впервые, что может говорить в пользу преобладания классического генотоксического пути канцерогенеза (табл. 4).

Таблица 4 – Связь экспрессии *AhR* с наличием экспрессии *CYP1A1* в тканях пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Гистотип и статус курения	М.** <i>AhR</i>		
	Экспрессия <i>CYP1A1</i> отсутствует в нормальной и опухолевой ткани (контрольная группа)	Положительная экспрессия (Ст от 22 до 37)	
		Экспрессия <i>CYP1A1</i> присутствует в нормальной ткани	Экспрессия <i>CYP1A1</i> присутствует в опухолевой ткани
ПКРЛ курильщики	0,329	4,787	4,495*
АКЛ некурящие	0,917	1,596	—
АКЛ курильщики	2,238	0,547	1,230

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – медиана (М. = медиана) различий в уровнях мРНК *AhR* между тканями НМРЛ и образцами нормальной ткани, результат был нормирован к уровню мРНК в условно-нормальной ткани.

Рассматривая эпигенетические пути канцерогенеза легкого в нашей работе с целью поиска новых молекулярных маркеров, мы изучили уровень экспрессии отобранных ранее *AhR*-зависимых микроРНК-21, -342, -93, -181a, -146a и PD-L1, регулирующих микроРНК-155, -181a, -146a в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ. Результаты показали, что в опухолевых образцах пациентов курильщиков с ПКРЛ и АКЛ регистрируется снижение уровня экспрессии микроРНК-342 и -181 в несколько раз, что возможно связано с активацией *AhR* (репрессора *AhR*) под воздействием курения (Singh A. P. et al., 2010; Wang Q. et al., 2019) (табл. 5,6).

Таблица 5 – Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181a, -155, -146a в образцах тканей пациентов с плоскоклеточным раком легкого курильщиков (медиана и диапазон относительного изменения уровней микроРНК в опухолевой ткани по сравнению с парной условно-нормальной тканью) (miR – микроРНК)

N (число пациентов)	miR-21	miR-342	miR-93	miR-181a	miR-146a	miR-155
40	1,37 (0,02–11,65)	0,33* (0,01–2,63)	1,63 (0,02–10,02)	0,36* (0,01–2,90)	0,60 (0,01–8,57)	1,47 (0,01–13,24)

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 6 – Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181а, -155, -146а в образцах тканей пациентов с аденокарциномой легкого курильщиков (медиана и диапазон относительного изменения уровней микроРНК в опухолевой ткани по сравнению с парной условно-нормальной тканью) (miR – микроРНК)

N (число пациентов)	miR-21	miR-342	miR-93	miR-181a	miR-146a	miR-155
40	2,04* (0,17–14,00)	0,46** (0,05–4,68)	1,60* (0,23–7,81)	0,68* (0,09–5,32)	1,14 (0,09–33,17)	1,53* (0,29–12,41)
Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$).						

В то же время в опухолевых образцах АКЛ как у курильщиков, так и у некурящих пациентов отмечалось повышение уровня экспрессии микроРНК-21, -93, -155, что может свидетельствовать о классическом AhR-опосредованном механизме активации у пациентов курильщиков и вовлечении AhR-независимых механизмов у некурящих пациентов (табл. 6, 7).

Таблица 7 – Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181а, -155, -146а в образцах тканей пациентов с аденокарциномой легкого не курильщиков (медиана и диапазон относительного изменения уровней микроРНК в опухолевой ткани по сравнению с парной условно-нормальной тканью) (miR – микроРНК)

N (число пациентов)	miR-21	miR-342	miR-93	miR-181a	miR-146a	miR-155
40	4,06** (1,95–8,38)	0,93 (0,12–4,47)	2,84* (0,33–4,31)	0,86 (0,40–2,20)	1,22 (0,28–6,56)	2,76* (0,50–6,28)
Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$).						

Для доказательства роли AhR в регуляции экспрессии отобранных микроРНК был проведен анализ уровня экспрессии этих микроРНК в опухолевых образцах пациентов, разделенных на 2 группы с низким и высоким уровнем мРНК *AhR* (деление проводили по медианному значению).

В опухолевых образцах пациентов с ПКРЛ уровень экспрессии лишь одной микроРНК-93 снижался в 5 раз при высоком уровне экспрессии *AhR*, что, возможно, связано со сложной регуляцией этой микроРНК и ее двойкой ролью в канцерогенезе, когда она может выступать как онкогеном, так и онкосупрессором (Ashrafizadeh M. Et al., 2020). Для пациентов курильщиков с АКЛ были выявлены микроРНК, с большой вероятностью вовлеченные в

канцерогенез РЛ, так уровень экспрессии микроРНК-21, -342, -155 возрастал в 2 раза при высоком уровне экспрессии *AhR*, что вновь подтверждает классический путь активации *AhR*. Противоположенные результаты получены для некурящих пациентов с АКЛ, где уровень экспрессии микроРНК-342, -155 снижался в 2,5 и 4 раза соответственно при высокой экспрессии *AhR*, что свидетельствует о разных механизмах канцерогенеза у некурящих пациентов.

В нашей работе мы сопоставили уровень экспрессии *AhR*-регулируемых микроРНК и PD-L1-регулирующих микроРНК с уровнем PD-L1 в опухолевой ткани курящих пациентов, определенным методом ИГХ.

В опухолевой ткани пациентов курильщиков с ПКРЛ отмечено повышение уровня экспрессии микроРНК-93 и -155 в 4 и в 12 раз соответственно, а в опухолевой ткани пациентов курильщиков с АКЛ – многократное повышение экспрессии микроРНК-21 и -146а для опухолевых образцов с высокой экспрессией PD-L1 (TPS > 50 %) (табл. 38, 39). Полученные данные говорят об отсутствии прямого регулирующего влияния исследуемых микроРНК на экспрессию PD-L1 посредством связи с 3'UTR мРНК PD-L1, однако эти микроРНК могут быть вовлечены в регуляцию противоопухолевого иммунного ответа посредством более сложных механизмов.

Кроме того, при сопоставлении исследуемых микроРНК с клинико-патологическими параметрами (возрастом, размером опухоли и наличием метастазов в региональные л/узлы) была выявлена связь между снижением уровня экспрессии микроРНК-93 и возрастом пациентов (старше 67 лет), а снижение экспрессии микроРНК-181а, -155 было характерно для более поздних стадий РЛ. Данный факт позволяет обсуждать перспективность отобранных нами микроРНК в качестве дополнительных маркеров диагностики и прогноза, а также в качестве терапевтического агента.

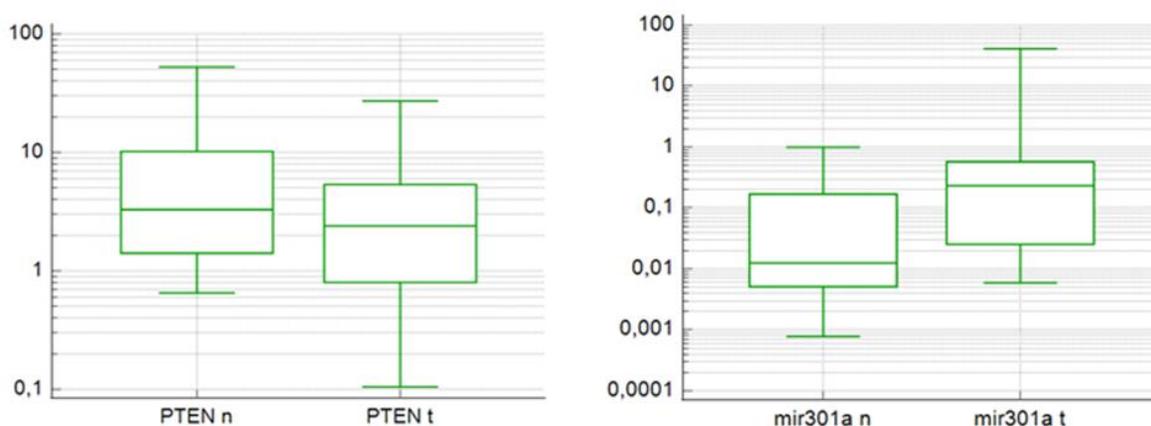
Исследование экспрессии гена *PTEN* в опухолевых образцах. Одним из подходов в изучении роли *AhR* в канцерогенезе рака легкого является исследование уровня экспрессии его генов-мишеней. Ранее мы провели БИ анализ и показали, что изменение экспрессии некоторых изучаемых нами микроРНК может, в свою очередь, менять экспрессию их общего гена-мишени *PTEN* в образцах НМРЛ. С учетом этих данных мы определили экспрессию мРНК *PTEN* в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ и сопоставили эти данные с экспрессией *AhR*-регулируемых микроРНК-21, -93, -181, -155 и PD-L1, регулирующей микроРНК-155 (табл. 8).

Таблица 8 – Относительные уровни мРНК *PTEN* в образцах тканей пациентов с немелкоклеточным раком легкого в зависимости от подтипа и статуса курения

N (число пациентов)	мРНК <i>PTEN</i> *	p-value
Плоскоклеточный рак легкого (курильщики)		
40	0,79 (0,05–2,90)	0,152
Аденокарцинома (курильщики)		
40	0,17 (0,01–6,34)	0,003
Аденокарцинома (некурящие)		
40	0,18 (0,04–1,01)	0,034

Примечание: * – медиана и диапазон относительного изменения уровней мРНК в опухоли легкого по сравнению с условно-нормальной тканью.

Уровень экспрессии гена *PTEN* существенно снижался в опухолевых образцах АКЛ курильщиков и некурящих пациентов почти в 5 раз, тогда как в опухолевых образцах ПКРЛ отмечалась тенденция к снижению экспрессии, но результаты не достигли статистической значимости.



Примечание: n – условно-нормальная прилежащая ткань, t – опухолевая ткань.

Рисунок 6 – Относительные уровни мРНК *PTEN* и микроРНК-301а в образцах опухолей плоскоклеточного рака легкого курильщиков и прилежащей условно-нормальной ткани легкого по результатам полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Результаты представлены в логарифмической шкале

Статистически значимая отрицательная корреляция в экспрессии *PTEN* была выявлена только для PD-L1-регулирующей микроРНК-155 у некурящих пациентов с АКЛ ($-0,761$, $p = 0,03$) и микроРНК-301а у пациентов курильщиков

с ПКРЛ (рис. 6). Тогда как *AhR*-зависимая микроРНК-93 геном-мишенью которых является *PTEN* демонстрировала статистически значимую положительную корреляцию с уровнем мРНК *PTEN* у пациентов курильщиков с АКЛ (0,505; $p = 0,028$). Вероятно, эта микроРНК вовлечена в более сложные механизмы регуляции *PTEN* (Li C. et al., 2017).

При изучении экспрессию *PTEN* в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ в зависимости от уровня экспрессии *AhR* (деление проводили по медианному значению) было показано многократное увеличение экспрессии *PTEN* при высокой экспрессии *AhR* у пациентов курильщиков с АКЛ. Этот показатель также менялся и у некурящих пациентов с АКЛ, но не так значительно (увеличение в 3 раза) (табл. 9).

Таблица 9 – Относительный уровень экспрессии *PTEN* в образцах тканей немелкоклеточного рака легкого (медиана и диапазон относительного изменения уровней мРНК в опухоли по сравнению с парной условно-нормальной тканью) в зависимости от уровня экспрессии *AhR*

Ген	Низкая экспрессия <i>AhR</i> ($< M_{AhR}$)			Высокая экспрессия <i>AhR</i> ($\geq M_{AhR}$)		
	мед.	мин.	макс.	мед.	мин.	макс.
Плоскоклеточный рак легкого						
<i>PTEN</i>	0,295	0,047	2,900	0,956	0,337	1,910
Аденокарцинома (курильщики)						
<i>PTEN</i>	0,098*	0,013	0,818	0,609*	0,086	6,342
Аденокарцинома (некурящие)						
<i>PTEN</i>	0,074**	0,037	0,173	0,210**	0,185	1,009
Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$).						

Кроме этого, мы сопоставили уровень экспрессии *PTEN* и *AhR* с уровнем PD-L1 у пациентов курильщиков с НМРЛ (табл. 10, 11). Следует отметить, что получено статистически значимое снижение экспрессии *PTEN* в опухолевых образцах курящих пациентов с АКЛ с умеренным уровнем PD-L1 (TPS 1–49 %) (табл. 11). Для пациентов курильщиков с ПКРЛ такой связи не выявлено (табл. 10). Таким образом, мы не увидели прямой взаимосвязи между высоким уровнем PD-L1 в опухоли и уровнем экспрессии *PTEN*, что, вероятно, можно объяснить гетерогенностью опухоли и вовлечением многоуровневых механизмов регуляции процессов канцерогенеза (Álvarez-García V. et al., 2019). При оценке взаимосвязи экспрессии *AhR* с уровнем PD-L1 было получено статистически значимое повышение уровня экспрессии *AhR* у пациентов с высоким уровнем PD-L1 (TPS > 50 %) только для курильщиков с АКЛ, что хорошо согласуется с нашими данными о повышении уровня экспрессии

CYP1A1 у этих пациентов (табл. 11). Для пациентов курильщиков с ПКРЛ было показано статистически значимое снижение уровня экспрессии *AhR* в 4 раза в группе пациентов с умеренной экспрессией PD-L1 (TPS 1–49 %) по сравнению с группой пациентов, у которых экспрессия отсутствует (TPS 0 %) (табл. 10).

Таблица 10 – Ассоциация уровней экспрессии мРНК *PTEN* и *AhR* со статусом PD-L1 (TPS 0 %, TPS 1–49 %, TPS 50–100 %) у курящих пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого

мРНК	PD-L1-статус (%)	Медианное значение	Диапазон		р-значение		
			min	max	Соотношение уровня TPS (%)		
					0/1–49	0/50–100	1–49/50–100
<i>PTEN</i>	0	0,652	0,264	0,980	0,494	0,516	0,976
	1–49	1,058	0,047	2,900			
	50–100	1,678	0,098	2,820			
<i>AhR</i>	0	0,826	0,110	13,993	0,049*	1,000	0,371
	1–49	0,221	0,031	1,523			
	50–100	2,557	0,281	9,352			

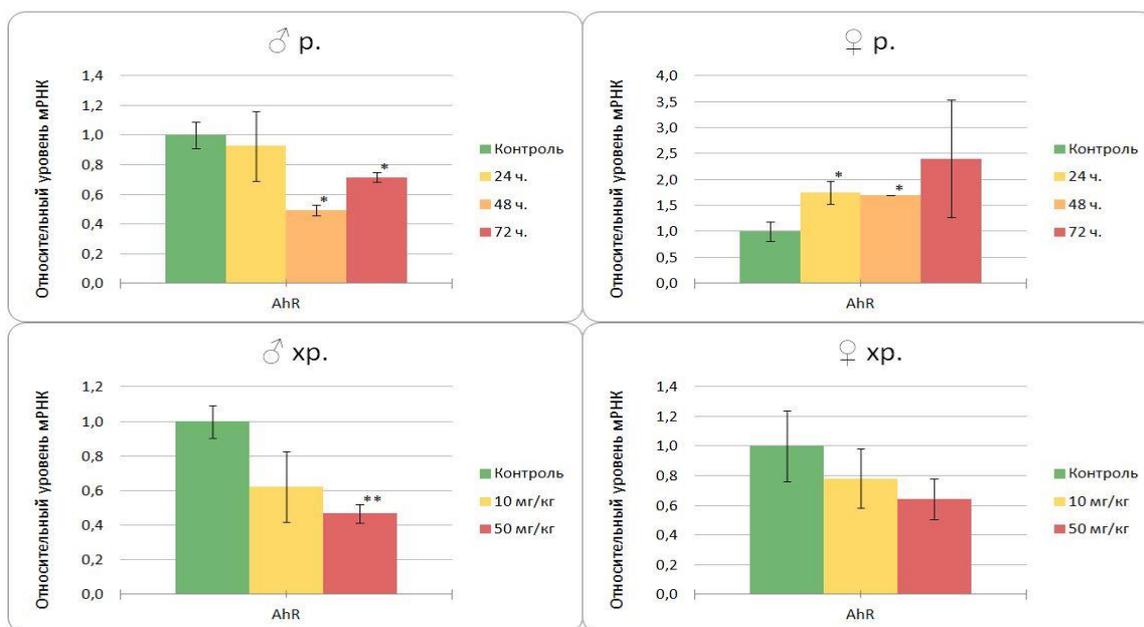
Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 11 – Ассоциация уровней экспрессии мРНК *PTEN* и *AhR* со статусом PD-L1 (TPS 0 %, TPS 1–49 %, TPS 50–100 %) у курящих пациентов с диагнозом аденокарцинома легкого

мРНК	PD-L1-статус (%)	Медианное значение	Диапазон		р-значение		
			min	max	Соотношение уровня TPS (%)		
					0/1–49	0/50–100	1–49/50–100
<i>PTEN</i>	0	0,404	0,054	1,494	0,043*	0,237	0,134
	1–49	0,092	0,013	0,173			
	50–100	3,394	0,446	6,342			
<i>AhR</i>	0	1,153	0,157	2,530	0,957	0,041*	0,067
	1–49	0,558	0,126	2,238			
	50–100	13,075	3,707	22,444			

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Исследование эффектов бензо(а)пирена на экспрессию *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AhR*, *AhR*-зависимых микроРНК и их генов-мишеней в легких самцов и самок крыс. При изучении влияния бензо(а)пирена на экспрессию *AhR* были получены различающиеся результаты для самцов и самок крыс. Более значимые изменения экспрессии *AhR* были выявлены при хроническом введении БП и заключались в снижении экспрессии, причем у самцов это снижение было достоверно при дозе 50 мг/кг, у самок изменения статистически недостоверны (рис. 7).



Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0.05$) по критерию Стьюдента; ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0.01$) по критерию Стьюдента.

Рисунок 7 – Относительный уровень экспрессии гена *AhR* в легких крыс Вистар, обработанных бензо(а)пиреном по схеме: ♂ p. – разовое введение бензо(а)пирена (75 мг/кг) самцам крыс Вистар ($n = 4$); ♀ p. – разовое введение бензо(а)пирена (75 мг/кг) самкам крыс Вистар ($n = 4$); ♂ хр. – хроническое введение бензо(а)пирена (12 недель, с периодичностью 1 раз в неделю) самцам крыс Вистар ($n = 4$); ♀ хр. – хроническое введение бензо(а)пирена (12 недель, с периодичностью 1 раз в неделю) самкам крыс Вистар ($n = 4$)

Активацию *AhR* под действием БП оценивали по изменению экспрессии его генов-мишеней – *CYP1A1*, *CYP1B1*. Как при однократном, так и при хроническом введении БП, относительный уровень мРНК *CYP1A1* и *CYP1B1* многократно увеличивался в легких самцов и самок крыс (табл. 12,15).

Таблица 12 – Относительный уровень мРНК *CYP1A1*, *CYP1B1*, *EMP2*, *IGF1*, *IGF2*, *ITGA6*, *PTEN*, *SLC34A2* в легких самцов и самок крыс линии Вистар после однократного введения бензо(а)пирена (доза 75 мг/кг)

мРНК	Однократное введение БП (75 мг/кг)							
	♂				♀			
	контроль	24 часа	48 часов	72 часа	контроль	24 часа	48 часов	72 часа
<i>CYP1A1</i>	1,0 ± 0,5	53 ± 13**	31 ± 2**	34 ± 5**	1,0 ± 0,9	46 ± 2*	33 ± 4*	51 ± 17*
<i>CYP1B1</i>	1,0 ± 0,7	43 ± 20*	26 ± 5*	45 ± 12*	1,0 ± 0,4	39 ± 9*	32 ± 26	73 ± 17*
<i>EMP2</i>	1,00 ± 0,07	2,0 ± 0,4*	1,30 ± 0,09*	2,2 ± 0,4*	1,00 ± 0,06	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,5	2,0 ± 0,5*
<i>IGF1</i>	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,5	2,4 ± 1,0	3,3 ± 1,4
<i>IGF2</i>	1,0 ± 0,3	3,2 ± 0,7*	1,20 ± 0,01	1,6 ± 0,4	1,0 ± 0,9	1,4 ± 1,0	2,2 ± 0,9	4,3 ± 3,8
<i>ITGA6</i>	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1*	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2
<i>PTEN</i>	1,00 ± 0,02	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1*	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,20 ± 0,04	0,9 ± 0,3
<i>SLC34A2</i>	1,0 ± 0,2	3,7 ± 0,7**	2,4 ± 0,3*	4,2 ± 0,4**	1,0 ± 0,4	1,9 ± 0,7	2,6 ± 0,5*	3,6 ± 0,6*

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента; ** – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента.

Значительное повышение экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* было выявлено при однократном воздействии (в 26–73 раза) по сравнению с хроническим воздействием, где повышение экспрессии было в среднем в 5 раз (табл. 12). Более того, мы получили и гендерные различия в экспрессии *CYP1A1*, в легких самок в среднем в 1,5–2,0 раза она выше, чем у самцов (табл. 12).

В нашем исследовании мы впервые получили результаты, доказывающие влияние бензо(а)пирена на экспрессию микроРНК у самок и самцов крыс. С помощью биоинформатического анализа отобраны четыре микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р, в промоторах генов или их генов-хозяев которых были обнаружены сайты связывания с AhR. Полученные результаты показали изменение экспрессии микроРНК в зависимости от однократного или хронического введения бензо(а)пирена. Более того, мы наблюдали и гендерные различия. Наибольшие изменения коснулись экспрессии микроРНК-22-3р, т. к. у самцов ее уровень достоверно увеличивался в 1,7–2,4 раза, тогда как у самок в первый день падал в 2 раза (табл. 13).

Таблица 13 – Относительный уровень AhR-регулируемых микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р в легких самцов и самок крыс Вистар после однократного введения бензо(а)пирена (доза 75 мг/кг)

miRs	Однократное введение БП (75 мг/кг)							
	♂				♀			
	контроль	24 часа	48 часов	72 часа	контроль	24 часа	48 часов	72 часа
miR-22-3р	1,00 ± 0,07	2,4 ± 0,2**	1,70 ± 0,04**	1,44 ± 0,30	1,00 ± 0,02	0,50 ± 0,01**	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,3
miR-29а-3р	1,00 ± 0,06	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,30 ± 0,04	1,00 ± 0,03	0,40 ± 0,04**	1,0 ± 0,02	0,9 ± 0,1
miR-193b-5р	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3
miR-483-3р	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,6	0,7 ± 0,2	1,00 ± 0,04	2,1 ± 0,2**	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,04*

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,05); ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,01) по критерию Стьюдента.

При хроническом воздействии у самцов обнаружено статистически значимое повышение уровня всех исследуемых микроРНК в 1,5–2,2 раза, за исключением микроРНК-483-3р, уровень экспрессии которой был в 2,5 раза ниже, чем в контрольной группе. У самок значимых различий в экспрессии не было выявлено (табл. 14).

Таблица 14 – Относительный уровень AhR-зависимых микроРНК-22-3р, -29а, -3р, -193b-5р, -483-3р в легких самцов и самок крыс Вистар после хронического введения бензо(а)пирена (дозы 10 мг/кг и 50 мг/кг)

miRs	Хроническое введение БП					
	♂			♀		
	контроль	10 мг/кг	50 мг/кг	контроль	10 мг/кг	50 мг/кг
miR-22-3р	1,00 ± 0,05	1,7 ± 0,2*	2,0 ± 0,2*	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,4
miR-29а-3р	1,0 ± 0,1	2,2 ± 0,7*	2,0 ± 0,2**	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1
miR-193b-5р	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3*	1,7 ± 0,5	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
miR-483-3р	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,4 ± 0,1*	1,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2*	1,1 ± 0,5

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,05); ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p < 0,01) по критерию Стьюдента.

При однократном введении БП у самцов отмечалось снижение экспрессии *PTEN* в 1,7 раз спустя 48 часов после инъекции, у самок достоверных изменений не выявлено (табл. 12).

Таблица 15 – Относительный уровень мРНК *CYP1A1*, *CYP1B1*, *EMP2*, *IGF1*, *IGF2*, *ITGA6*, *PTEN*, *SLC34A2* в легких самцов и самок крыс линии Вистар после хронического введения бензо(а)пирена (дозы 10 мг/кг и 50 мг/кг)

мРНК	Хроническое введение БП					
	♂			♀		
	контроль	10 мг/кг	50 мг/кг	контроль	10 мг/кг	50 мг/кг
<i>CYP1A1</i>	1,0 ± 0,5	1,8 ± 0,09*	7,9 ± 2,8*	1,0 ± 0,3	9,5 ± 7,6	19 ± 3,8*
<i>CYP1B1</i>	1,0 ± 0,5	1,9 ± 0,5	19 ± 10*	1,0 ± 0,1	2,4 ± 1,2	9,2 ± 2,2*
<i>EMP2</i>	1,00 ± 0,07	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	2,1 ± 0,2*	1,4 ± 0,5
<i>IGF1</i>	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,5	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	0,3 ± 0,1**
<i>IGF2</i>	1,0 ± 0,7	0,8 ± 0,6	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,07*	0,3 ± 0,2*
<i>ITGA6</i>	1,0 ± 0,05	0,5 ± 0,2*	0,3 ± 0,04**	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1*	0,5 ± 0,1*
<i>PTEN</i>	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,2*	0,6 ± 0,1*	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2*
<i>SLC34A2</i>	1,0 ± 0,09	1,8 ± 0,5*	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,2

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента; ** – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента.

При хроническом введении БП отмечалось снижение экспрессии *PTEN* в 1,7-3,3 раза у обоих полов при дозах 10 и 50 мг/кг ($p < 0,05$) (табл. 15).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования подтвердили высокую долю курильщиков среди пациентов с НМРЛ: 87,89% и 64,02% для ПКРЛ и АКЛ соответственно, при этом курение существенно снижало медиану выживаемости у пациентов с ПКРЛ в 1,92 раза, с АКЛ – в 1,32 раза. Согласно данным TCGA и проведенным нами исследованиям курение меняет биологию опухоли, что требует новых подходов к лечению таких пациентов с учетом статуса курения. Мы выявили ряд микроРНК: микроРНК-21, -93, 146а, -181а, -342, -155, экспрессия которых различается для ПКРЛ и АКЛ у курящих и некурящих пациентов. Данные микроРНК и их гены-мишени могут быть потенциальными маркерами, позволяющими характеризовать опухоли в зависимости от статуса курения, что важно для лечения пациентов с НМРЛ. Более того, экспрессия микроРНК различна для опухолей с разной экспрессией PD-L1. Важным результатом проведенного исследования является выяснение роли онкосупрессора *PTEN*,

экспрессия которого также зависит от курения. Определение его экспрессии методами ОТ-ПЦР, ИГХ в опухолях курящих пациентов с НМРЛ, может быть важным показателем применения терапии с использованием киназных ингибиторов сигнальных путей (PI3K, АКТ, mTOR).

ВЫВОДЫ

1. Выживаемость пациентов с немелкоклеточным раком легкого зависит от гистотипа, пола, возраста, стадии и статуса курения. Медиана выживаемости для пациентов с плоскоклеточным раком легкого составляет 14,5 месяца, для пациентов с аденокарциномой легкого – 18 месяцев. Длительный анамнез курения снижал медиану выживаемости у пациентов с плоскоклеточным раком легкого в 1,92 раза, с аденокарциномой легкого в 1,32 раза. Длительное курение приводило к более раннему возникновению рака легкого у курильщиков по сравнению с некурящими: плоскоклеточный рак легкого возникает раньше в среднем на 4,03 года, а аденокарцинома легкого – на 5,29 лет. У женщин плоскоклеточный рак легкого встречается в 2,3 раза реже, чем у мужчин. Медиана выживаемости у женщин с аденокарциномой легкого в 2,01 раза выше, чем у мужчин.

2. Частота мутации (del19, L858R) в гене *EGFR* в опухолях курящих и некурящих пациентов мужского пола с аденокарциномой составляет 2,6 % и 6 % соответственно, у некурящих женщин этот показатель достигает 35,5 %. Интервальное определение данных мутаций (каждые 3 месяца) в образцах плазмы крови пациентов, получавших тирозинкиназные ингибиторы, позволяет выявить доклинический рецидив заболевания.

3. Дендритные клетки являются потенциальными компонентами иммунотерапии, так как созревание и функциональная активность их субпопуляций у пациентов с немелкоклеточным раком легкого снижены по сравнению с условно-здоровыми людьми.

4. Анализ данных TCGA показал изменение уровней экспрессии *AhR* и его генов-мишеней в образцах опухолей немелкоклеточного рака легкого. Средние значения показателя уровня экспрессии *AhR* в злокачественных тканях были ниже в 1,45 раза, чем в нормальной ткани. Уровни экспрессии *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *PD-L1* снижены в 3 раза по сравнению с нормальной тканью. Курение достоверно снижает уровень мРНК *AhR* в образцах аденокарциномы легкого относительно группы некурящих пациентов и не влияет на уровни экспрессии *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *PD-L1* в образцах как аденокарциномы легкого, так и плоскоклеточного рака легкого.

5. В опухолевых образцах курящих пациентов с плоскоклеточным раком легкого уровень мРНК *AhR* повышался в 1,5 раза и снижался в 1,5 раза у курильщиков с аденокарциномой легкого. У некурящих пациентов экспрессия *AhR* не менялась. Экспрессия *CYP1A1* повышалась в опухолях курящих пациентов с плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой легкого в 47% и в 42% случаев соответственно и отсутствовала у некурящих пациентов с аденокарциномой легкого. Экспрессия *CYP1A1* ассоциирована с высокой

экспрессией *AhR* в опухолях курящих пациентов с плоскоклеточным раком легкого.

6. Уровень экспрессии *AhR*-регулируемых микроРНК-21, -93, 146a, -181a, -342, а также PD-L1-регулирующей микроРНК-155 меняется в зависимости от курения, гистотипа, уровня экспрессии PD-L1, *AhR* и стадии, что позволяет рассматривать их как дополнительные маркеры типирования немелкоклеточного рака легкого с учетом этих параметров.

7. Биоинформатический анализ данных TCGA показал снижение экспрессии гена *PTEN* в опухолевых образцах немелкоклеточного рака легкого. Курение вызывает достоверное снижение уровня мРНК *PTEN* у пациентов с плоскоклеточным раком легкого. Экспрессия онкосупрессора *PTEN*, потенциального маркера немелкоклеточного рака легкого, зависит от гистотипа, курения и экспрессии микроРНК-301a, -155, -93.

8. Моделирование хронического воздействия бензо(а)пирена, компонента сигаретного дыма, на легкие крыс выявило зависимое от пола усиление экспрессии генов-мишеней *AhR* – *CYP1A1*, *CYP1B1* и *AhR*-регулируемых микроРНК-22-3p, -29a-3p, -193b-5p, а также снижение экспрессии *PTEN* независимо от пола.

9. Алгоритм лечения немелкоклеточного рака легкого включает следующие этапы: установление гистотипа и стадии заболевания; учет пола, возраста, статуса курения; выявление мутаций в генах *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* в образцах аденокарциномы легкого; определение статуса PD-L1, экспрессии *AhR*-регулируемых, PD-L1-регулирующих и *PTEN*-регулирующих микроРНК, экспрессии *CYP1A1* и *PTEN*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При формировании стратегии лекарственного лечения немелкоклеточного рака легкого необходимо учитывать комплекс клинических параметров: стадию, возраст, гистологический подтип (плоскоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого), пол, статус курения и их сочетание.

2. Рассматривать максимально эффективную (сочетание полихимиотерапии с иммунотерапией или с ингибиторами VEGFR) лекарственную терапию в первой линии у пациентов мужчин с аденокарциномой и длительным анамнезом курения, так как сочетание этих факторов приводит к наихудшим показателям выживаемости.

3. Для оптимального подбора иммунотерапии при плоскоклеточном раке легкого необходимо определять не только экспрессию PD-L1, но и белка *PTEN* методом иммуногистохимического исследования. При высокой экспрессии PD-L1 (выше 50 %) и отсутствии экспрессии *PTEN* отдавать предпочтение комбинированной химио-иммунотерапии.

4. Для диагностики целесообразно проводить дополнительную оценку молекулярных маркеров у пациентов с плоскоклеточным раком легкого с

определением уровня микроРНК-181а, -155, -93, снижение их уровня экспрессии связано с более запущенной стадией заболевания.

5. Повышение уровня экспрессии микроРНК-93, -155 для плоскоклеточного рака легкого и повышение микроРНК-21, -146а для аденокарциномы легкого курильщиков ассоциировано с высокой экспрессией PD-L1, что определяет выбор варианта лекарственной терапии.

6. У пациентов с метастатической аденокарциномой легкого и подтвержденными мутациями в гене *EGFR* (del19, L858R), получающих тирозинкиназные ингибиторы, необходимо проводить интервальное определение этих мутаций в образцах плазмы крови (каждые 3 месяца после начала лечения), что позволит выявить доклинический рецидив заболевания и своевременно скорректировать план лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А., Карпинская Е.В., Шевченко С.П., Ахмерова Л.Г., Иванов М.К., **Козлов В.В.**, Елисафенко Е.А., Гуляева Л.Ф., Жимулев И.Ф. МикроРНК, ЭВОЛЮЦИЯ И РАК // Цитология. – 2013. – Том 55. – №3. – С. 159-164.

2. Savelyeva A.V., Kuligina E.V., Bariakin D.N., **Kozlov V.V.**, Ryabchikova E.I., Richter V.A., Semenov D.V. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions // Biomed Res Int. – 2017. – 2017:7404912.

3. **Kozlov V.**, Karpov I., Kovalenko S., Shamanin V. Adenocarcinoma of the lung with rare insertion mutation in EGFR exon 19 that had partial response to gefitinib: a case report // Exp Oncol. – 2017. – V. 39(2). – P. 155-156.

4. Irina Obleukhova, Nataliya Kiryishina, Svetlana Falaleeva, Julia Lopatnikova, Vasily Kurilin, **Vadim Kozlov**, Aleksander Vitsin, Andrey Cherkasov, Ekaterina Kulikova, Sergey Sennikov Use of antigen primed dendritic cells for inducing antitumor immune responses in vitro in patients with non-small cell lung cancer // Oncol Lett. – 2018. – V. 15(1). – P. 1297-1306.

5. Uljana A. Boyarskikh, Alexandra S. Shadrina, Mariya A. Smetanina, Yakov A. Tsepilov, Igor P. Oscorbin, **Vadim V. Kozlov**, Alexander E. Kel, Maxim L. Filipenko. Mycoplasma hyorhinis reduces sensitivity of human lung carcinoma cells to Nutlin-3 and promotes their malignant phenotype // J Cancer Res Clin Oncol. – 2018. – V. 144(7). – P. 1289-1300.

6. Шаманин В.А., Карпов И.В., Гервас П.А., Чердынцева Н.В., Симолина Е.И., **Козлов В.В.**, Коваленко. Мониторинг мутаций в гене EGFR в циркулирующей ДНК плазмы крови больных С.П. Немелкоклеточным раком легкого // СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. – 2018. – Том 17. – №5. – С. 52–59.

7. **Козлов В.В.**, Гуляева Л.Ф. Возможности последовательной таргетной терапии EGFR-позитивного немелкоклеточного рака легкого // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2019. – Том 8. – №4. – С. 290-294.

8. Бадаев Е.А., **Козлов В.В.**, Квон Т.А., Гуляева Л.Ф. Анализ соматических мутаций в гене EGFR у курящих и некурящих больных аденокарциномой легкого // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Том. 22. – №4. – С. 35–42.

9. Igor P. Oscorbin, Alexandra S. Shadrina, **Vadim V. Kozlov**, Vladimir E. Voitsitsky, Maxim L. Filipenko. Absence of EGFR C797S Mutation in Tyrosine Kinase Inhibitor-Naïve Non–Small Cell Lung Cancer Tissues // *Pathol Oncol Res.* – 2020. – V. 26(2). – P. 1229-1234.

10. Филиппов С.В., Ярушкин А.А., Яковлева А.К., **Козлов В.В.**, Гуляева Л.Ф. Влияние бенз[а]пирена на экспрессию AhR-регулируемых микроРНК в лёгких самок и самцов крыс // Биомедицинская химия. – 2020. – Том. 66. – № 3 – С. 224-232.

11. Чернова Г.Е., **Козлов В.В.**, Гуляева Л.Ф. Анализ выживаемости пациентов с немелкоклеточным раком легкого в Новосибирской области за период 2015–2019 гг // Альманах клинической медицины. – 2022. – Том. 50. – №1. – С. 56–64.

12. Akhmetova D.A., **Kozlov V.V.**, Gulyaeva L.F. New Insight into the Role of AhR in Lung Carcinogenesis // *BIOCHEMISTRY (Moscow)*. – 2022. – V. 87(11). – P. 1219-1225.

ПАТЕНТЫ

1. Сенников С.В., Облеухова И.А., Лопатникова Ю.А., Вицин А.Е., **Козлов В.В.** Способ генерации цитотоксических клеток с активностью против немелкоклеточного рака легкого // №2577992, приоритет от 18.07.2014, опубликовано 20.03.2016, Бюл. №4.

2. Сенников С.В., Облеухова И.А., Лопатникова Ю.А., Вицин А.Е., **Козлов В.В.**, Кирюшина Н.А. Способ индукции противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа с помощью дендритных клеток, трансфицированных РНК опухолевых клеток, против немелкоклеточного рака легкого // №2578008, приоритет от 17.04.2015, опубликовано 20.03.2016, Бюлл. №8

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКЛ	аденокарцинома легкого
БИ	биоинформатика
БП	бензо(а)пирен
ДК	дендритная клетка
мДК	миелоидная дендритная клетка
пДК	плазмоцитоидная дендритная клетка

ИТК	ингибиторы тирозинкиназы
НМРЛ	немелкоклеточный рак легкого
НСО	Новосибирская область
ПКРЛ	плоскоклеточный рак легкого
РЛ	рак легкого
AhR	арил-углеводородный рецептор
CYP1A1	цитохром P450, семейство 1, подсемейство А
CYP1B1	цитохром P450, семейство 1, подсемейство В
EMP2	эпителиальный мембранный белок 2
IGF1	инсулиноподобный фактор роста 1
IGF2	инсулиноподобный фактор роста 2
ITGA6	интегрин α6
PD-L1	лиганд рецептора программированной смерти 1
PTEN	онкосупрессор гомолог тензина и фосфотазы
SLC34A2	ген, кодирующий натрий зависимый транспортный белок 2В фосфатов
TPS	соотношения опухолевых клеток с позитивным окрашиванием мембраны к общему количеству опухолевых клеток

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФИЦ ФТМ, особенно Конончуку Владиславу Владимировичу и Калининой Татьяне Сергеевне, за постоянную помощь и поддержку в осуществлении экспериментальной части моей работы.

Выражаю искреннюю благодарность моим научным консультантам и вдохновителям за помощь, поддержку и рождение новых научных идей Гуляевой Людмиле Фёдоровне и Красильникову Сергею Эдуардовичу.

Особой благодарностью хотелось бы отметить д.м.н., профессора Войцицкого Владимира Евгеньевича за поддержку и постоянный интерес к моей работе.

Выражаю благодарность д.б.н. Филиппенко Максиму Леонидовичу, к.б.н. Боярских Ульяне Александровне, д.б.н. Коваленко за помощь в проведении анализа мутаций в гене *EGFR*, а также д.м.н. Сенникову С. В. – за исследование дендритных клеток.

Выражаю большую благодарность клиническому ординатору ИМПЗ НГУ Черновой Галине Евгеньевне за помощь в подготовке эпидемиологической части моей работы.

Выражаю также благодарность всему коллективу ГБУЗ НСО «НОКОД», особенно сотрудникам онкологического отделения №3 Миклину А.О., Нибожину А.В., Костенко Р.В., Романенко Л.А., Ахмедову А.Д., а также заместителю главного врача по лечебной работе Колотовой Н.М. и главному врачу д.м.н. Фурсову Сергею Александровичу за постоянную поддержку и понимание.