

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

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

Новосибирск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 17 |
| 1.1 Классификация рака легкого | 17 |
| 1.2 Эпидемиология рака легкого | 23 |
| 1.3 Факторы окружающей среды, влияющие на возникновение рака легкого .. | 27 |
| 1.4 <i>EGFR</i> – драйверный ген немелкоклеточного рака легкого | 35 |
| 1.5 Ингибиторы тирозинкиназ разного поколения в лечении немелкоклеточного рака легкого | 39 |
| 1.6 Роль иммунного контроля в канцерогенезе легкого | 47 |
| 1.7 Роль арил-углеводородного рецептора в канцерогенезе легкого, механизм токсического действия бензо(а)пирена | 52 |
| 1.8 Роль микроРНК в канцерогенезе легкого. | 62 |
| 1.9 Фосфоинозитол 3-киназный путь (PI3K) в канцерогенезе легкого. | 72 |
| ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 83 |
| 2.1 Характеристика экспериментального материала | 83 |
| 2.2 Характеристика клинического материала | 84 |
| 2.3 Биоинформатические методы исследования | 88 |
| 2.4 Методы молекулярного исследования на опухолевых образцах пациентов с немелкоклеточным раком легкого | 89 |
| 2.5 Иммунофлуоресцентное исследование | 97 |
| 2.6 Иммуногистохимическое исследование | 99 |
| 2.7 Фенотипическая и функциональная характеристика подтипов дендритных клеток периферической крови больных с немелкоклеточным раком легкого | 100 |
| 2.8 Статистическая обработка данных | 101 |
| 2.9 Соблюдение этических стандартов | 103 |
| ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ | 104 |
| 3.1 Оценка влияние разных факторов на выживаемость у пациентов с | |

| | |
|---|-----|
| немелкоклеточным раком легкого Новосибирской области. | 104 |
| 3.2 Анализ соматических мутаций в гене <i>EGFR</i> у курящих и некурящих пациентов с аденокарциномой легкого | 120 |
| 3.3 Возможности «жидкой» биопсии в оценке резистентности к тирозинкиназным ингибиторам при <i>EGFR</i> мутированном немелкоклеточном раке легкого | 122 |
| 3.4 Дендритные клетки в индукции противоопухолевого клеточного ответа . . | 140 |
| 3.5 Биоинформатический анализ | 144 |
| 3.6 Характеристика опухолевых образцов пациентов с немелкоклеточным раком легкого по уровню экспрессии <i>AhR</i> , <i>CYP1A1</i> , <i>AhR</i> -регулируемых микроРНК в зависимости от статуса курения и <i>PD-L1</i> | 164 |
| 3.7 Исследование экспрессии гена <i>PTEN</i> в опухолевых образцах. | 175 |
| 3.8 Исследование эффектов бензо(а)пирена на экспрессию <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>AhR</i> , <i>AhR</i> -зависимых микроРНК и их генов-мишеней в легких самцов и самок крыс | 183 |
| ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ | 195 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ. | 223 |
| ВЫВОДЫ. | 229 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. | 232 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ. | 233 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. | 235 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А (информационное) Потенциальный алгоритм диагностики и лечения плоскоклеточного рака легкого. | 279 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б (информационное) Потенциальный алгоритм диагностики и лечения аденокарциномы легкого. | 280 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной 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 % [7, 134, 135, 301]. Наряду с этим смертность от РЛ в Новосибирской области (НСО) несколько превышает мировые показатели и составила в 2021 году 19,7 % [9, 10]. Показатели заболеваемости РЛ в России незначительно снизились за последние 3 года: в 2019 году этот показатель составил 40,96 на 100 тыс. населения, а в 2021 году – 38,62 на 100 тыс. населения. Такая же тенденция намечена и в НСО: в 2019 году заболеваемость составила 48,43 на 100 тыс. населения, в 2021 году – 36,76 на 100 тыс. населения. Однако при этом в НСО сохраняются высокие показатели смертности от РЛ, что составило 41,85 на 100 тыс. населения в 2019 году и 40,96 на 100 тыс. населения в 2021 году. Кроме того, в НСО отмечается неблагоприятный показатель одногодичной летальности, так в 2019 году он составил 49,9 %, а в 2021 году – 50,8 %. Такая ситуация отчасти может объясняться поздней диагностикой, доля впервые выявленных пациентов с четвертой терминальной стадией РЛ в РФ в 2021 году составила 42 % случаев, а в НСО – 41,5 % [9, 10]. Более того, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) прогнозирует дальнейший рост заболеваемости РЛ во всем мире; например, в 2020 году было выявлено 2,2 млн новых случаев РЛ, а в 2040 году этот показатель может составить 3,5 млн новых случаев [134, 301].

Известно, что РЛ делится на две основные гистологические группы: мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), что составляет около 15 % от всех случаев РЛ, и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), что составляет до 85 % случаев. В свою очередь, основными гистологическими подтипами НМРЛ является аденокарцинома (около 40 % случаев), плоскоклеточный рак легкого (около 30 %) и крупноклеточная карцинома (около 15 % случаев) [239, 301, 308].

Важно отметить, что в настоящее время имеется тенденция к росту частоты встречаемости аденокарциномы у некурящих пациентов, тогда как удельный вес плоскоклеточного рака легкого курильщиков снижается [346]. Этот факт в настоящее время пока не имеет научного объяснения.

Рак легкого относят к неблагоприятным формам рака в плане общей 5-летней выживаемости и заболеванию с высоким потенциалом к рецидиву. Основные трудности в лечении РЛ возникают при его диссеминированных формах, когда показатели общей 5-летней выживаемости не превышают 4 % [9, 10]. 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 [67]. Химиотерапия не является избирательной и в 50 % случаев проводится напрасно [78].

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 НМРЛ. Речь идет об открытии мутаций в гене *EGFR*, прежде всего Del19 и L858R, которые усиливают онкогенную функцию рецептора, что сопровождается усилением пролиферации. В связи с этим появились лекарственные препараты (ингибиторы тирозинкиназы (ИТК) 1-го поколения), такие как гефитиниб и эрлотиниб, нацеленные на мутантный рецептор, что позволило увеличивать выживаемость без прогрессирования у пациентов в 2 раза [101, 119]. Далее в клиническую практику были введены ИТК 2-го и 3-го поколения: афатиниб и осимертиниб соответственно. Важно отметить, что в аденокарциномах частота мутаций в гене *EGFR* в европейской популяции не превышает 15–20 %, а в азиатской группе – 40–50 % [53, 104]. Кроме этого, было отмечено, что на фоне таргетной терапии часто возникает резистентность к проводимому лечению, и в 60 % случаев это обусловлено появлением повторной мутации T790M [24, 103]. Осимертиниб обладает активностью в отношении мутации T790M, однако и на фоне этой терапии возникает

резистентность, в частности, обусловленная мутацией C797S. Поэтому, в настоящее время, ведется активный поиск новых таргетных препаратов с возможностью воздействия на эту мишень [276]. Известно, что в аденокарциноме встречаются другие, более редкие, молекулярные перестройки, которые являются мишенями для лечения, к ним относятся транслокация ALK (частота 4–6 %), ROS1 (1–2 %), мутация в гене BRAF (около 1 %) [117].

Таким образом, очевидно, что частота встречаемости всех мутаций, обуславливающих назначение таргетной терапии в аденокарциноме легкого, не превышает 30 %, тогда как при плоскоклеточном раке таких мутаций 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.

Следует отметить, что частота описанных выше мутаций зависит как от национальных, так и региональных особенностей. Выявление этого показателя может помочь в оценке мутационной нагрузки для каждого региона, что представляет большой интерес для профилактических мероприятий. В Новосибирской области такой оценки ранее не проводилось.

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 [72, 160].

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 [222]. 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) одним из компонентов табачного дыма – бензо(а)пиреном – 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.

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 [65, 192, 223, 350].

Считается доказанным, что одним из основных факторов риска развития РЛ является курение, однако лечение пациентов до сих пор проводится без учета этого факта. Между тем, исследования последних лет 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 [261, 324]. Все это указывает на необходимость дальнейших исследований в этой области с целью улучшения результатов лечения рака легкого [241, 358].

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 [51, 134, 135, 301]. В большинстве случаев статистические базы оценки заболеваемости и смертности от РЛ учитывают возраст, пол, стадию, при этом не

принимают во внимание гистологический тип опухоли, статус курения и сочетания этих клинических факторов [6, 9, 10, 51, 97]. Разделение в диагностике и лечении НМРЛ на аденокарциному легкого (АКЛ) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) диктуется современным развитием исследований в этом направлении, так как известен факт, что ПКРЛ в большей степени связан с курением и отсутствием 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 [53, 97, 122, 182, 309, 329]. 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 [277, 284, 316]. 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 [46, 57, 69, 71, 188, 199, 263, 292, 296, 324]. Решению обозначенной проблемы и посвящена тема настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования

Провести сравнительный клинико-anamнестический анализ немелкоклеточного рака легкого и молекулярно-генетическое исследование опухолей для диагностики и лечения у курящих и некурящих пациентов.

Задачи исследования

1. Провести клинико-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-22-3p, -29a-3p, -193b-5p, -483-3p) 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 и 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 (ПРЛ – 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 аденокарциномой легкого 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*, *CYP 1A2*, *CYP 1B1* и экспрессии *PTEN* при хроническом введении бензо(а)пирена, компонента сигаретного дыма, крысам, зависит от пола.

Степень достоверности

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 использовались 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 онко-пульмонологическом 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Классификация рака легкого

Классификация рака, как гистологическая, так и по системе TNM претерпевала неоднократные изменения за последние десятилетия. Однако прежде чем перейти к обсуждению современной классификации рака легкого интересно будет рассмотреть исторические вехи появления термина «рак легкого».

Надо отметить, что еще в 1810 году известный французский врач и патологоанатом G. Bayle при вскрытии 3 умерших больных туберкулезом легких выявил «раковую чахотку», и это можно считать первым статистическим сведением о раке легкого, более того этот ученый написал трактат о раковых заболеваниях, хотя данная работа была опубликована после его смерти в 1833 году. Интересно отметить, что и до настоящего времени в некоторых клинических ситуациях довольно трудно дифференцировать рак легкого и туберкулез, а иногда встречаются и сочетания двух патологий [11].

Так или иначе, с течением времени в 1821 году G. Andral предложил ставить диагноз рака легкого по обрывкам «мозговика» или «скирра» в мокроте, так как опухолевая ткань легкого напоминала ткань головного мозга на разрезе, и подобные обрывки опухолевой ткани пациент мог откашливать при далеко зашедшей стадии и распаде опухоли. Однако точный диагноз рака легкого (РЛ) при микроскопии мокроты был установлен американским врачом Остином Флинтом в 1868 году. Тем не менее, авторство термина «рак легкого», как первичной злокачественной опухоли легкого, все же отдают G. Bayle [96].

В современной онкологии существуют разные определения РЛ, но наиболее просто и емко можно сформулировать так: это собирательное понятие, включающее различные по происхождению, гистологической структуре, клиническому течению и результатам лечения злокачественные эпителиальные

опухоли, развивающиеся в слизистой бронхов, бронхиол и слизистой бронхиальных желез [14, 18].

С учетом развития научной базы, появления новых методов диагностики и расширения границ понимания процессов канцерогенеза, в настоящее время существует большое количество классификаций РЛ. Основными классификациями рака легкого, которые могут учитываться при выборе методов лечения и при прогнозировании, являются: клиничко-анатомическая, гистологическая классификация ВОЗ, по стадиям и по Международной системе TNM. Нужно отметить, что все эти классификации постоянно совершенствуются по мере накопления опыта [12, 18].

Клиничко-анатомическая классификация

Центральный рак легкого – возникает из эпителия в крупных бронхах (главном, долеом, сегментарном и субсегментарном), обычно опухоль визуализируется в просвете бронхов при проведении фибробронхоскопии (ФБС). По направлению роста выделяют: экзофитный рак, когда опухоль растет в просвет бронха; эндофитный рак, с преимущественным ростом опухоли в толщу легочной паренхимы; разветвленный рак, имеющий муфтообразный, перибронхиальный тип роста.

Периферический рак легкого – исходит из эпителия более мелких бронхов или локализуется в паренхиме легкого. Различают узловую округлую опухоль, пневмониеподобный рак и рак верхушки легкого (синдром Панкоста).

Атипичные формы рака – медиастинальная форма рака легкого, милиарный карциноматоз [5].

Международная классификация по стадиям

В настоящее время во всем мире используется 8-ой пересмотр классификации рака легкого по системе TNM, что позволяет унифицировать подходы к лечению в зависимости от стадии процесса (Таблица 1) [12, 259].

Таблица 1 – Распределение рака легкого по стадиям и системе TNM

| Стадия | Значение T | Значение N | Значение M |
|---------------------|--------------|------------|------------|
| Окультная карцинома | Tx | N0 | M0 |
| Стадия 0 | Tis | N0 | M0 |
| Стадия IA | T1 | N0 | M0 |
| Стадия IA1 | T1mi | N0 | M0 |
| | T1a | N0 | M0 |
| Стадия IA2 | T1b | N0 | M0 |
| Стадия IA3 | N1c | N0 | M0 |
| Стадия IB | T2a | N0 | M0 |
| Стадия IIА | T2b | N0 | M0 |
| Стадия IIB | T1a-c, T2a,b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Стадия IIIА | T1a-c, T2a,b | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T4 | N0, N1 | M0 |
| Стадия IIIB | T1a-c, T2a,b | N3 | M0 |
| | T3, T4 | N2 | M0 |
| Стадия IIIC | T3, T4 | N3 | M0 |
| Стадия IV | Любая T | Любая N | M1 |
| Стадия IVA | Любая T | Любая N | M1a, M1b |
| Стадия IVB | Любая T | Любая N | M1c |

Гистологическая классификация ВОЗ

Первая классификация РЛ по ВОЗ была представлена еще в 1967 году, затем эта классификация многократно пересматривалась, и последняя версия была представлена в 2015 году. В этой версии учитываются современные представления о раке легкого, как о заболевании, являющемся результатом множества сложных морфологических, молекулярных и генетических изменений, и классификация с учетом этих изменений, в свою очередь, представляет клинический интерес для подбора точечной или таргетной терапии рака легкого (Таблица 2) [321].

Таблица 2 – Классификация рака легкого (Всемирная организация здравоохранения, 2015)

| Гистологический тип | ICDO код | Гистологический тип | ICDO код |
|--|----------|--|----------|
| Эпителиальные опухоли | | Папилломы | |
| Аденокарцинома (АК) | 8 140/3 | Плоскоклеточная папиллома | 8 052/0 |
| Липидическая АК | 8 250/3 | Экзофитная | 8 053/0 |
| Ацинарная АК | 8 551/3 | Инвертированная | 8 053/0 |
| Папиллярная АК | 8 260/3 | Железистая папиллома | 8 260/0 |
| Микропапиллярная АК | 8 265/3 | Смешанная папиллярная и железистая папиллома | 8 560/0 |
| Солидная АК | 8 230/3 | Аденоматоз | |
| Инвазивная муцинозная АК | 8 253/3 | Склерозирующая пневматома | 8 832/0 |
| Сочетание инвазивной муцинозной АК и немучинозной АК | 8 254/3 | Альвеолярная аденома | 8 251/0 |
| Коллоидная АК | 8 480/3 | Папиллярная аденома | 8 260/0 |
| Эмбриональная АК | 8 333/3 | Муцинозная цистаденома | 8 470/0 |
| Кишечная АК | 8 144/3 | Аденома слизистых желез | 8 480/0 |
| Минимально инвазивная АК не муцинозная | 8 256/3 | Мезенхимальные опухоли | |
| Минимально инвазивная АК муцинозная | 8 257/3 | Легочная гамартома | 8 992/0 |
| Атипичная аденоматозная гиперплазия | 8 250/3 | Хондрома | 9 220/0 |
| АК in situ немучинозная | 8 250/2 | Пекоматозные опухоли | |
| АК in situ муцинозная | 8 253/2 | Лимфангиолейомиоматоз | 9 174/1 |
| Плоскоклеточная карцинома | 8 070/3 | Доброкачественная пекома | 8 714/0 |
| Плоскоклеточная карцинома с ороговением | 8 071/3 | Светлоклеточная опухоль | 8 005/0 |
| Плоскоклеточная карцинома без ороговения | 8 072/3 | Малигнизированная пекома | 8 714/3 |
| Базалоидная плоскоклеточная карцинома | 8 083/3 | Врожденная перибронхиальная миофибробластическая опухоль | 8 827/1 |

Продолжение таблицы 2

| Гистологический тип | ICDO код | Гистологический тип | ICDO код |
|--|----------|--|----------|
| Эпителиальные опухоли | | Диффузный легочной лимфангиоматоз | |
| Плоскоклеточная карцинома in situ | 8 070/2 | Воспалительная миофибробластическая опухоль | 8 825/1 |
| Нейроэндокринные опухоли (НЭО) | | | |
| Мелкоклеточная карцинома | 8 041/3 | Эпителиоидная гемангиоэндотелиома | 9 133/3 |
| Комбинированная мелкоклеточная карцинома | 8 045/3 | Плевропульмональная бластома | 8 973/3 |
| Крупноклеточная нейроэндокринная карцинома | 8 013/3 | Синовиальная саркома | 9 040/3 |
| Комбинированная крупноклеточная нейроэндокринная карцинома | 8 013/3 | Саркома интимы легочной артерии | 9 137/3 |
| Типичный карциноид | 8 240/3 | Легочная миксоидная саркома с транслокацией EWSR1 – CREB1 | 8 842/3 |
| Атипичный карциноид | 8 249/3 | Миоэпителиальные опухоли | |
| Диффузная идиопатическая легочная нейроэндокринная клеточная гиперплазия | 8 040/0 | Миоэпителиома | 8 982/0 |
| | | Миоэпителиальная карцинома | 8 982/3 |
| Крупноклеточная карцинома | 8 012/3 | Лимфогистиоцитарные опухоли | |
| Аденосквамозная карцинома | 8 560/3 | Лимфомы наружной маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (лимфома MALT) | 9699/3 |
| Саркоматоидные карциномы | | | |
| Плеоморфная карцинома | 8 022/3 | | |
| Веретеночклеточная карцинома | 8 032/3 | Диффузная крупноклеточная лимфома | 9 680/3 |
| Гигантоклеточная карцинома | 8 031/3 | Лимфоматоидный гранулематоз | 9 766/1 |
| Карциносаркома | 8 980/3 | Внутрисосудистая крупно В-клеточная лимфома | 9 712/3 |

Продолжение таблицы 2

| Гистологический тип | ICDO код | Гистологический тип | ICDO код |
|---|----------|---------------------------------|----------|
| Саркоматоидные карциномы | | Лимфогистиоцитарные опухоли | |
| Легочная бластома | 8 972/3 | Легочной гистиоцитозЛангерганса | 9 751/1 |
| | | Болезнь Эрдгейма – Честера | 9 750/1 |
| Другие и не классифицируемые карциномы | | Эктопированные опухоли | |
| Лимфоэпителиомоподобная карцинома | 8 082/3 | Опухоли из зародышевых клеток | |
| NUT карцинома | 8 023/3 | Зрелая тератома | 9 080/0 |
| Опухоли типа слюнных желез | | Незрелая тератома | 9 080/1 |
| Мукоэпидермоидная карцинома | 8 430/3 | Внутрилегочная тимома | 8 580/3 |
| Аденоидно кистозная карцинома | 8 200/3 | Меланома | 8 270/3 |
| Эпителиально-миоэпителиальная карцинома | 8 562/3 | Менингиома | 9 530/0 |
| Плеоморфная аденома | 8 940/0 | Метастатические опухоли | |

Другой акцент в классификации ВОЗ сделан на «малые» биопсии, когда не удастся получить большое количество опухолевого материала у больных с метастатическими формами рака легкого, но в то же время у этой категории пациентов крайне важно получить точный и развернутый патоморфологический диагноз.

В заключении необходимо затронуть основные изменения, которые произошли в классификации ВОЗ для аденокарциномы легкого (АКЛ) и плоскоклеточного рака легкого (ПКРЛ).

В новой гистологической классификации исключено понятие «бронхиолоальвеолярный рак легкого» (БАР) и введено два новых – аденокарцинома *in situ* (AIS) и минимально инвазивная аденокарцинома (MIA) [321]. Различные гистологические подтипы аденокарциномы легкого могут влиять на прогноз. Например, аденокарциномы с преобладанием липидического роста характеризуются хорошим прогнозом [333]. Микропапиллярный подтип

аденокарциномы связан с плохим прогнозом по общей выживаемости и имеет высокий риск возникновения местного рецидива при экономных резекциях легкого [155, 197]. Преобладание солидного компонента аденокарциномы является независимым фактором раннего появления отдаленных метастазов. Более того, новые данные свидетельствуют о том, что микропапиллярный или солидный преобладающий подтип аденокарциномы легкого является фактором повышенной чувствительности к адъювантной химиотерапии в сравнении с ацинарным или папиллярным преобладающим подтипом при оценке безрецидивной выживаемости у пациентов после хирургического лечения [307].

Что касается ПКРЛ, то такие его подтипы, как папиллярная, светлоклеточная и мелкоклеточная карциномы удалены из классификации, т. к. они встречаются очень редко и могут быть ошибочно приняты за другие виды РЛ. Напротив, базалоидный подтип выделен из категории крупноклеточных карцином по причине наличия экспрессии маркеров плоскоклеточного рака [184]. Зачастую трудно дифференцировать аденокарциному от плоскоклеточного типа рака легкого только на основании гистологической оценки, в таком случае рекомендуется проводить иммуногистохимическое исследование (ИГХ), при котором надежным маркером плоскоклеточного рака являются p40 и p63 [278]. Надо отметить, что до сих пор плоскоклеточный рак легкого не имеет предсказательных маркеров ответа на разные виды лечения, за исключением экспрессии PD-L1 [185].

1.2 Эпидемиология рака легкого

Уровень заболеваемости РЛ растет во всем мире, в то же время этот показатель различается в зависимости от географического расположения стран, степени употребления табака и загрязнения воздуха [331]. По данным сайта Интернационального Агентства Исследований Рака и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак легкого занимает первое место в структуре смертности от злокачественных новообразований во всем мире. Статистически

в 2020 году от РЛ умерло 1,8 млн человек. В тоже время в этом же году выявлено 2,2 млн новых случаев рака легкого [134, 135].

Известно, что на эпидемиологию РЛ могут влиять различные факторы, к таковым можно отнести возраст, пол, этническую принадлежность, географическое расположение территории, уровень образованности, профессию, уровень жизни и доходов населения [331]. Так, например, в США было показано, что курение встречается гораздо чаще среди людей с образованием ниже среднего (до 32,1 % по сравнению с выпускниками колледжей с уровнем курения 9,1 %). Аналогичная ситуация и по показателю заболеваемости РЛ, он составил среди лиц, не закончивших школу, 166,6 на 100 тыс. населения по сравнению с 57,6 на 100 тыс. населения среди людей, которые закончили колледж. Более того, образованные люди имеют больше возможностей для доступа ко всем опциям здравоохранения, что приводит к неравенству в показателях смертности и выживаемости [301].

Как и большинство видов рака, рак легкого имеет прямую зависимость от возраста, что может быть связано с биологическими факторами, которые приводят к повреждению ДНК с течением времени. По статистике в США примерно 53 % случаев РЛ встречаются в возрасте от 55 до 74 лет, и 37 % случаев у пациентов старше 75 лет [90, 347]. Средний возраст пациентов при выявлении РЛ в России в 2019 году составил 66 лет для обеих полов [9, 10]. Тем не менее, рак легкого может встречаться у молодых пациентов. Показано, что в возрасте моложе 55 лет встречается примерно 10 % случаев РЛ. При изучении пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) в возрасте от 20 до 46 лет было установлено, что чаще всего это женщины, с гистологическим типом аденокарциномы, некурящие, которые часто имеют местно-распространенную или метастатическую форму заболевания [58]. У данной группы пациентов необходимо рассматривать другие этиологические факторы, такие как пассивное курение, облучение бытовым радоном, воздействие асбеста, мышьяка, выхлопной газ автомобилей, дымовые выбросы промышленных предприятий, хроническая обструктивная болезнь легких, генетические факторы [195]. Более того

многофакторный анализ аденокарциномы некурильщиков показал лучшие показатели общей выживаемости по сравнению с аденокарциномой курильщика (5-летняя выживаемость 23 % и 16 % соответственно) [86].

Исторически мужчины больше потребляют табака, чем женщины, в связи с чем заболеваемость РЛ среди мужчин выше, чем среди женщин. Более того, курение чаще связано с плоскоклеточным раком легкого. Существуют противоречивые данные о том, что женщины в большей степени уязвимы для развития РЛ. Отмечено, что некурящие женщины имеют более высокий уровень заболеваемости РЛ, чем некурящие мужчины. Более того, женщины с НМРЛ чаще имеют мутацию в рецепторе EGFR и аденокарциному с липидическим характером роста [163]. В исследованиях было показано, что некоторые генетические мутации, встречающиеся у курящих женщин, могут predispose к развитию РЛ, такие как избыточная экспрессия гена *CYP1A1*, инактивирующая мутация в гене фермента глутатион-S-трансферазы M1, мутация гена *TP53* и избыточная экспрессия X-связанного гастрин-высвобождающего пептидного рецептора. Также обсуждается вопрос гормонального влияния на развитие РЛ у женщин. Интересно, что рецептор ER α не встречается в нормальной ткани легкого, но в то же время этот рецептор избыточно экспрессируется в аденокарциноме легкого у женщин. В некоторых исследованиях было показано, что заместительная терапия эстрогенами связана с повышением риска развития РЛ на 50 % у женщин, которые ее использовали в течение 10 лет и более, в то время как наступление ранней менопаузы, возраст моложе 40 лет, напротив, ассоциируется с низким риском возникновения РЛ [178]. В целом рак легкого у женщин имеет некоторые уникальные поведенческие особенности, выражающиеся в особенностях гистологического строения, исходе и прогнозе заболевания, отличающиеся от РЛ мужчин [52, 240].

В некоторых регионах мира, в частности в Азии, степень загрязнения воздуха внутри помещений и радиационный фон очень высокие, что играет большую роль в росте заболеваемости РЛ среди женского населения [347]. Кроме

того, в Китае около 65 % мужского населения начинает курить в возрасте до 20 лет, что может привести к эпидемии рака легкого в этой стране [331].

В России общая 5-летняя выживаемость пациентов с диагнозом РЛ в 2019 составила 45 %, тогда как в 2009 году этот показатель составлял 36,9 %; таким образом, отмечена устойчивая тенденция к увеличению выживаемости пациентов с РЛ за последние 10 лет. Однако сохраняются негативные показатели ранней выявляемости РЛ: в России в 2019 г. выявлялось лишь 29,1 % случаев с I и II стадией, а на III-IV стадии приходится 69,6 %; в 2009 г. эти показатели составляли 26,5 % и 68,4 % соответственно. В 2019 году в России было выявлено 49 145 новых случаев рака легкого, а летальность в том же году составила 20,9 % [9, 10].

В США смертность от рака легкого выше, чем смертность от рака молочной железы, рака предстательной железы и рака ободочной кишки вместе взятых [259, 276]. Общая 5-летняя выживаемость для всех стадий РЛ в США в период 2003–2009 гг. составила всего 18 % [347].

Интересен факт, что в последнее время в Европе отмечался рост заболеваемости РЛ среди женщин, а в 2017 году впервые показатели смертности от рака легкого превысили показатели смертности от рака молочной железы, что составило 14,6 и 14,0 на 100 тыс. населения соответственно [112].

Таким образом видно, что эпидемиология рака легкого разнообразна и основана на разных факторах способных так или иначе влиять на возникновение РЛ. Очевидны тенденции в установлении разных эпидемиологических причин возникновения РЛ у мужчин и женщин. Более того с течением времени открываются новые механизмы, способные влиять на рост заболеваемости РЛ в разных социально-этнических и возрастных группах.

1.3 Факторы окружающей среды, влияющие на возникновение рака легкого

По данным ВОЗ более 1 млрд человек во всем мире курят табак и около 7 млн человек в год погибает от причин, связанных с курением. Около 80–90 % случаев рака легкого связано с курением. Во время курения помимо никотина в организм попадает около 8 000 соединений, из них 73 соединения, по данным Международного агентства по изучению рака, признано канцерогенами [144, 237].

Наиболее известные канцерогены в табачном дыме можно разделить на группы, такие как альдегиды и продукты сгорания (акрилонитрил, ацетальдегид, бензол, ацетамид, формальдегид, винилхлорид), металлы (кадмий, мышьяк, никель, свинец), N-нитрозамины (N-нитрозонорникотин, N-нитрозопирролидин, 4-(N-нитрозометиламино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон (ННК), N-нитрозодиметиламин); полиароматические углеводороды (ПАУ) (бензо(а)пирен, бенз(а)антрацен, 2-аминонафталин) [8].

Самым известным веществом в табачном дыме является никотин. Однако никотин не оказывает прямого повреждающего эффекта на клетки, но может способствовать выживаемости и пролиферации первично трансформированных клеток путем ингибирования апоптоза и активации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChRs) и β -адренергических рецепторов (β -AR). Кроме того, путем N-нитрозирования никотина могут образовываться такие канцерогены как табакоспецифические N-нитрозамины (Рисунок 1) [237, 303].

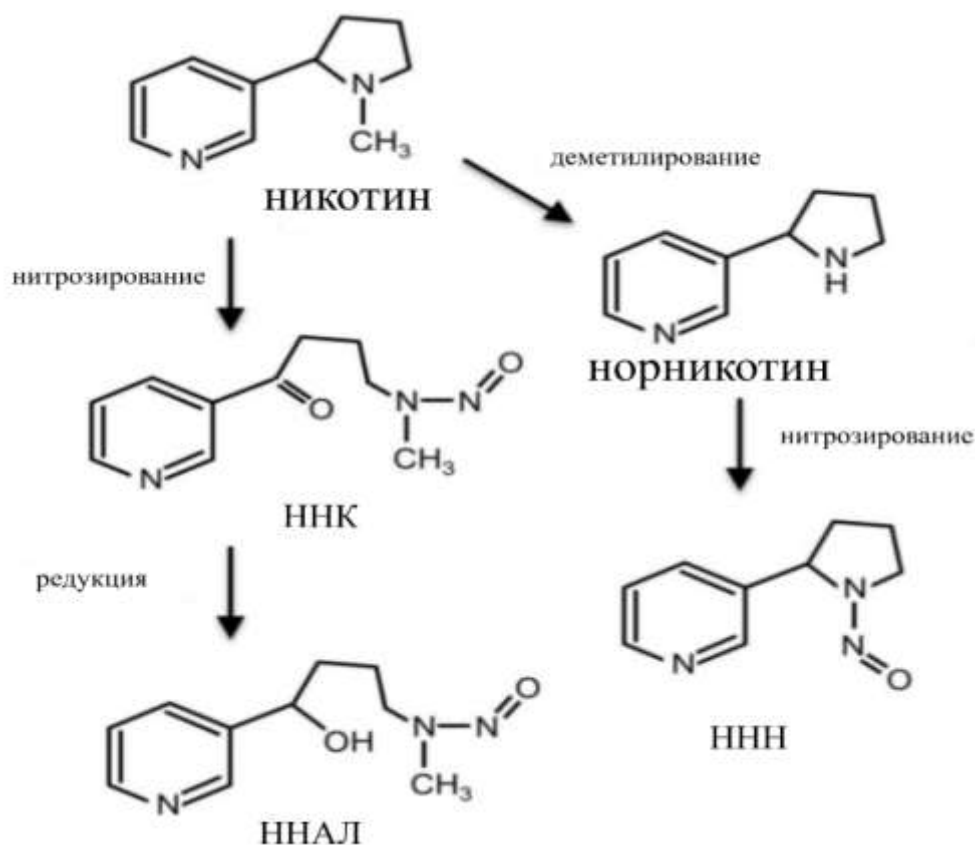


Рисунок 1 – Табакоспецифические N-нитрозамины: ННН (N-нитрозонорникотин);
 ННК (4-(метилнитрозамин)-1-(3-пиридил)-1-бутанон);
 ННАЛ (4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанол) [64]

Подробно механизм опосредованного канцерогенеза никотина через N-нитрозамины изучила группа ученых из Тайваня во главе с Wan-Li Cheng. Табакоспецифические N-нитрозамины могут вызывать образование аддуктов ДНК, которые способствуют мутациям генов-супрессоров опухолей, включая *Rb* и *P53*. Основной канцерогенный механизм метаболитов никотина (ННН и ННК) реализуется путем связывания с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами, в частности с рецептором $\alpha 7$ nAChR [140, 237]. Активность связывания ННК с $\alpha 7$ nAChR в 1 300 раз выше, чем у никотина. В исследовании Wan-Li Cheng было показано, что экспрессия различных субъединиц рецептора nAChR ($\alpha 7$, dup $\alpha 7$, $\alpha 5$, $\alpha 9$) значительно выше у пациентов курильщиков, страдающих РЛ, и слабо экспрессируются в аденокарциномах не курильщиков, что может подтверждать

канцерогенный эффект активации этих рецепторов [116, 237]. Также интересен факт, что у пациентов с мелкоклеточным раком легкого, который ассоциируется с интенсивным курением, экспрессия рецептора nAChR очень высока, а преобладание субъединиц $\alpha 7$ и $\alpha 5$ этого рецептора связано с плохим прогнозом. Рецептор $\alpha 7$ nAChR является ключевым в ННК-опосредованной пролиферации бронхиального эпителия, активация этого рецептора может инициировать клеточную инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход при НМРЛ. Более того, рецептор nAChR часто ко-экспрессируется с β -AR и EGFR на опухолевых клетках, что может приводить к прогрессированию рака легкого (Рисунок 2) [237, 290].

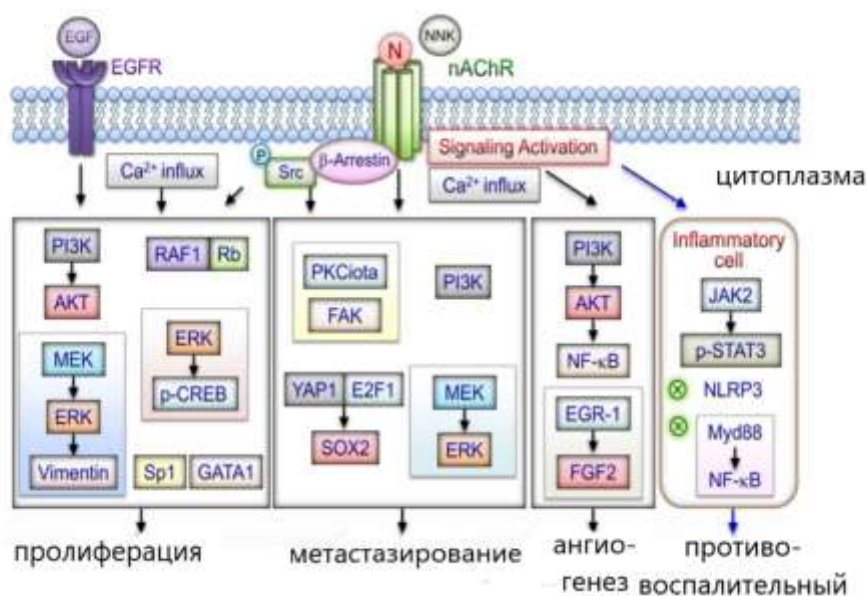


Рисунок 2 – nAChR-опосредованные сигнальные пути, приводящие к прогрессированию рака легкого [237]

Таким образом, очевидно, что никотин и его производные N-нитрозамины связаны с риском развития рака легкого у курильщиков, причем чаще всего это касается плоскоклеточной и мелкоклеточной карцином. Высокая экспрессия рецептора $\alpha 7$ nAChR в опухоли ассоциирована с плохим прогнозом и, возможно, с резистентностью к проводимой лекарственной терапии рака легкого. С другой стороны, изучение возможности ингибирования и блокирования никотиновых

ацетилхолиновых рецепторов в опухоли может привести к созданию новых лекарственных агентов для лечения рака легкого [237].

Как уже упоминалось, сигаретный дым – это сложное сочетание веществ, которые могут как сами быть прямыми канцерогенами, так и выступать в качестве ко-канцерогенов. Такие вещества были изучены в конденсате табачного дыма – это фенол и катехол, предшественниками которых являются целлюлоза и хлорогеновая кислота, находящиеся в табаке. Эти вещества в эксперименте на мышах не вызывали рост злокачественных опухолей, однако катехол выступает мощным ко-канцерогеном бензо(а)пирена (БП) [144].

Известно, что воспалительные заболевания легких, например, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), тесно связаны с риском возникновения рака легкого. В этом контексте табачный дым запускает ряд провоспалительных механизмов в легких посредством активации транскрипционного фактора NF-κB. В покоящейся клетке NF-κB находится в неактивном состоянии и ингибируется белком IκB. В результате воздействия различных воспалительных стимуляторов, одним из которых является и табачный дым, происходит фосфорилирование IκB с помощью киназы (IKK), в частности, IκB-киназы β, при этом NF-κB высвобождается из ингибирующего комплекса, перемещается в ядро и активирует транскрипцию контролируемых генов, что вызывает воспалительный ответ [144]. Кроме этого, БП также может активировать фактор NF-κB и арил-углеводородный рецептор (AhR), например, RelA/p65 субъединицу NF-κB, тогда AhR совместно трансактивирует промотор протоонкогена c-Myc и стимулирует пролиферацию клеток [1].

Ранее было доказано, что ряд канцерогенов, содержащихся в табачном дыме, могут обладать прямым генотоксическим эффектом, к ним относятся полиароматические углеводороды (ПАУ). Краткий механизм активации ПАУ заключается в том, что ряд ферментов цитохрома P450 окисляют эти углеводороды с образованием эпоксидов. В свою очередь, эпоксиды алкилируют нуклеофильные группы азотистых оснований ДНК с образованием их аддуктов и далее, как итог, ДНК-аддукты могут вызывать различные соматические мутации,

в частности, мутации в генах *TP53* и *KRAS*, которые напрямую участвуют в канцерогенезе легкого [144, 316].

Интересно, что существуют гендерные различия рака легкого, которые заключаются в различиях по гистотипу, выживаемости, генетических изменениях в опухоли, что может говорить о разных механизмах канцерогенеза у мужчин и женщин [143]. Исходя из различий в канцерогенезе РЛ, возможно, существует гендерная разница в механизмах влияния табачного дыма. С одной стороны, не было получено убедительных доказательств, что женщины, которые курят, более подвержены развитию РЛ, чем мужчины. С другой стороны, никогда не курившие женщины чаще болеют раком легкого, чем мужчины, у них чаще встречается аденокарцинома, молодой возраст, выявляется мутация в гене *EGFR* [181, 373]. В первую очередь, на развитие рака легкого может влиять гормональный статус у женщин. Этот факт может быть подкреплён данными о том, что рецепторы эстрогенов (чаще $ER\beta$) присутствуют в опухолевой ткани легкого и могут ускорять метаболизм связанных с курением канцерогенов, что подтверждается более высоким уровнем ДНК-аддуктов полициклических ароматических углеводородов у курящих женщин по сравнению с мужчинами [85, 302, 304].

Тем не менее, сравнивая пациентов разных полов с длительным и интенсивным анамнезом курения, можно отметить больший риск возникновения рака легкого у женщин. Такая разница может объясняться различием в ферментативной активности генов, участвующих в метаболизме веществ, содержащихся в табачном дыме, в частности можно рассматривать разную активность цитохрома P450 [143]. В этом аспекте различия могут быть среди курильщиков не только разных полов, но и разных рас [127]. Например, низкий уровень изоформы P450 CYP1A1, который катализирует канцерогенные ПАУ в электрофильные метаболиты, и сочетание высокого уровня глутатион-S-трансферазы M1 (*GSTM1*), которая инактивирует эти производные, уменьшает риск рака легкого в 9 раз в японской популяции [8]. Как известно, зависимость от курения определяется никотином, и скорость его метаболизма напрямую связана с количеством потребляемых сигарет. Основным

катализатором метаболизма никотина является изоформа цитохрома P450 CYP2A6, а, следовательно, генетический полиморфизм этого цитохрома P450 может определять скорость образования промежуточных продуктов разрушения никотина, которые являются мощными канцерогенами, как, например, N-нитрозамины [241]. Низкая активность CYP2A6 приводит к более медленному метаболизму никотина и, вследствие этого, курильщик меньше потребляет сигарет, реже курит, что сопряжено с более низким риском развития рака легкого. Исследование на китайской популяции показало трехкратное снижение риска развития рака легкого у курильщиков с низкой метаболической активностью фермента CYP2A6 в сравнении с курильщиками, у которых этот фермент имеет нормальную активность [82, 345].

Хотя курение и является основным этиологическим фактором развития рака легкого, но не единственным, загрязнение окружающей среды в целом – это вторая наиболее частая причина рака легкого [3, 39, 131, 379]. Вследствие антропогенного влияния или природных источников в воздухе могут скапливаться различные химические вещества. К ним относят твердые частицы или газы (оксидов серы, оксида углерода, озона), органические соединения (ПАУ, смолы, продукты пиролиза лигнина, гопаны), металлы (свинец, ванадий и никель). Твердые частицы (ТЧ) классифицирую по их размерам, различают градацию ТЧ менее 10 мкм и ТЧ менее 2,5 мкм. Кроме этого, разделяют загрязнение атмосферного воздуха и загрязнение воздуха в домашних условиях [62, 314].

Существуют требования по качеству воздуха окружающей среды, установленными ВОЗ, так для ТЧ менее 10 мкм среднегодовые значения не должно превышать 20 мкг/м³, для ТЧ менее 2,5 мкм не более 10 мкг/м³. Однако, справедливость ради нужно отметить, что в большинстве развитых и развивающихся стран эти нормы не соблюдаются, и по этой причине ежегодно в мире сохраняется тенденция к увеличению смертности от РЛ [379].

Эпидемиологическая связь между загрязнением окружающей среды и заболеваемостью РЛ, была хорошо показана на примере китайской провинции

Юньнань, где до 1970-х годов местные жители использовали уголь в закрытых очагах для приготовления пищи и отопления помещений. Вследствие этого в жилых помещениях отмечалось большое скопления ТЧ, содержащих высокую концентрацию ПАУ, включая БП и полярные соединения, которые обладают высокой мутагенной активностью. Это привело к самой высокой заболеваемости РЛ в этой провинции, и лишь в 1990-х годах ситуацию удалось изменить с изменением образа жизни [62]. Интересную закономерность установил Raaschou-Nielsen, который показал, что риск развития рака легкого возрастает на 18 % при каждом увеличении на 5 мкг/м^3 ТЧ менее $2,5 \text{ мкм}$ в окружающей среде, и на 22 % при увеличении концентрации ТЧ менее 10 мкм на 10 мкг/м^3 [38].

На долю случаев РЛ, вызванных радоном, приходится от 3 % до 14 % случаев [360]. Радон – это природный радиоактивный газ с периодом полураспада 3,8 дня, который образуется при распаде радия-226, а он является продуктом распада урана-238 в земной коре. Высвобождаясь из земной коры, радон накапливается в подвальных помещениях или нижних этажах различных строений с плохой вентиляцией и может оказывать влияние на человеческий организм. Так как радон инертен, почти весь вдыхаемый газ выдыхается, однако радон распадается на так называемые дочерние продукты (короткоживущие радиоизотопы), к которым относятся полоний-218 и полоний-214. Эти радиоизотопы могут осаждаться на эпителии дыхательных путей и, с учетом их периода полураспада менее 30 мин, быстро распадаются в дыхательных путях и испускают альфа-частицы, способные повреждать клеточную ДНК, что лежит в основе канцерогенеза РЛ [150]. Комбинированное воздействие курения и радона может во много раз увеличивать риск развития рака легкого [274, 282, 331]. Например, работники шахт и рудной промышленности с воздействием радона и курильщики имеют в 10 раз больше вероятность заболеть раком легкого по сравнению с работниками некурильщиками. Также люди, злоупотребляющие курением и живущие в помещениях с высоким уровнем радона ($> 200 \text{ Бк/м}^3$), имеют риск заболеть раком легкого в 6–8 раз выше, чем люди некурильщики и живущие в тех же условиях [194, 360].

Одной из причин такого синергичного влияния курения и радона является ХОБЛ у курильщиков. Так, у здорового некурящего человека толщина слизистого слоя в бронхиальном дереве составляет 5 мм, тогда как у курильщика с ХОБЛ толщина слизистого слоя может достигать 15–35 мм. С одной стороны, увеличение слизистого слоя – это защитная реакция в ответ на воздействие табачного дыма, с другой стороны, реснитчатый эпителий утрачивает способность своевременной элиминации мокроты из бронхиального дерева и, тем самым, создаются условия для более длительного воздействия радиоактивных частиц радона [360]. Средний допустимый уровень радона в воздухе помещений составляет от 5 до 15 Бк/м³. При возрастании концентрации радона до 100 Бк/м³ риск развития рака легкого возрастает на 16 % [282].

Асбест – это класс природных волокнистых минералов, состоящий в основном из двух типов: серпентин (хризотил) и амфибол (амозит, крокидолит и тремолит). Этот минерал широко используется в промышленности и строительстве, начиная с XIX века и по сегодняшний день. Асбест относится к наиболее распространенному профессиональному канцерогенному фактору, который может повышать риск развития рака легкого. Эпидемиологические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что амфиболовые волокна являются более канцерогенными, чем хризотил. Однако необходимо отметить, что различные исследования, изучающие связь рака легкого с длительным воздействием асбеста, показали неоднозначные результаты. В одних исследованиях эта связь прослеживается достаточно четко, в других же воздействие только асбеста как единственного фактора агрессии не приводило к развитию рака легкого [86, 179, 331].

Курение, очевидно, может усиливать канцерогенный эффект асбеста. Некоторые исследования показали увеличение риска смерти от рака легкого у работников, занятых с асбестом, в 16 раз, если они выкуривают более 1 пачки сигарет в день. Такие же работники, которые выкуривают менее 1 пачки сигарет в день, имеют повышение риска смерти от рака легкого только в 9 раз [86].

С другой стороны, риск возникновения РЛ при воздействии только асбеста увеличивается в 6 раз, при воздействии только курения – в 11 раз, но при совместном воздействии и асбеста и курения увеличивается риск рака легкого в 59 раз. Этот факт еще раз подчеркивает важность мер как по снижению производственного воздействия асбеста на работников промышленной и строительной сферы, так и по борьбе с курением [86, 331].

1.4 *EGFR* – драйверный ген немелкоклеточного рака легкого

В основе передачи клеточных сигналов или сигнальной трансдукции лежит механизм, основанный на посттрансляционных модификациях белка, где ключевую роль играет реакция фосфорилирования: $Mg-ATP + \text{Протеин-OH} \rightarrow \text{Протеин-OPO}_3 + Mg-ADP$. Большую роль в этом процессе играют факторы роста. Факторы роста (GFs) и их специфические поверхностные клеточные рецепторы, которые обладают тирозинкиназной активностью, являются важными регуляторами многих биологических процессов, включая клеточный рост, дифференцировку, выживаемость, миграцию клеток, ангиогенез и клеточный гомеостаз. Наиболее изученной системой факторов роста и их рецепторов является семейство эпидермального фактора роста (EGF) [45, 197].

Семейство тирозинкиназных рецепторов *erbB* представлено четырьмя гомологичными белками: HER1 (EGFR/*ErbB1*), HER2 (*ErbB2/neu*), HER3 (*ErbB3*) и HER4 (*ErbB4*). В норме эти белки экспрессируются на клеточной мембране и играют ключевую роль в передаче каскада клеточных сигналов, регулируя рост и дифференцировку эпителиальных клеток. Эти рецепторы состоят из внеклеточного домена, одиночного гидрофобного трансмембранного сегмента и прилежащего к мембране внутриклеточного киназного домена с С-концевым хвостом. Белки *ErbB2* функционируют как гомо- и гетеродимеры. Из всех представителей этого семейства наиболее изученным являются рецепторы HER1 или EGFR, который играет одну из ключевых ролей в канцерогенезе легкого. Факторы роста, взаимодействуя с EGFR, индуцируют существенные

конформационные изменения во внеклеточном домене. Наиболее известными факторами роста являются трансформирующий фактор роста α ($TGF\alpha$), амфирегулин (AREG), бетацеллулин (BTC), эпиген (EPN), эфирегулин (EPR) и гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF0), которые содержат характерный EGF-подобный консенсусный домен, ответственный за связывание EGFR, включающий шесть пространственно консервативных остатков цистеина, образующих три межмолекулярные дисульфидные связи. Все лиганды EGFR транскрибируются как трансмембранные белки-предшественники и впоследствии расщепляются на плазматической мембране протеазами клеточной поверхности для высвобождения зрелых, активных факторов роста, компетентных связывать EGFR. Аффинность к рецептору EGFR этих факторов роста может варьировать в широких пределах [27, 100, 313]. Два лиганд-EGFR комплекса формируют димеры (спина к спине), в которых лиганды расположены по бокам комплекса. После этого внутриклеточный домен EGFR формирует ассиметричный димер, при этом С-терминальная часть активированной киназы димера взаимодействуют с N-концом другой киназы, что приводит к ее аллостерической стимуляции. Процесс димеризации может быть разнообразным в зависимости от типа рецепторов. Это могут быть гомодимеры, как в случае ErbB1, или гетеродимеры, как это происходит для ErbB1/ErbB2. От формирования таких димеров зависит весь последующий путь передачи клеточного сигнала. Чаще всего это дальнейшая трансдукция сигнала сначала к мембрано-ассоциированным белкам (например, RAS, Src) и дальше к MAP-киназным каскадам с последующей передачей сигнала либо цитозольным субстратам, либо ядерным транскрипционным факторам [313].

Ген *EGFR* включает 28 экзонов. Клинический интерес представляют экзоны 18–21, кодирующие внутриклеточный тирозинкиназный домен рецептора EGFR, в том числе карман для связывания с АТФ. Этот карман является гидрофобным и находится в задней части АТФ-связывающей щели тирозинкиназного домена, и состоит из 8 аминокислот: треонин в кодоне 790, «привратник» у входа в карман – глутамин в кодоне 791, лейцин в кодоне 792,

метионин в кодоне 793; пролин в кодоне 794; фенилаланин в кодоне 795; глицин в кодоне 796; цистеин в кодоне 797 (Рисунок 3) [351].

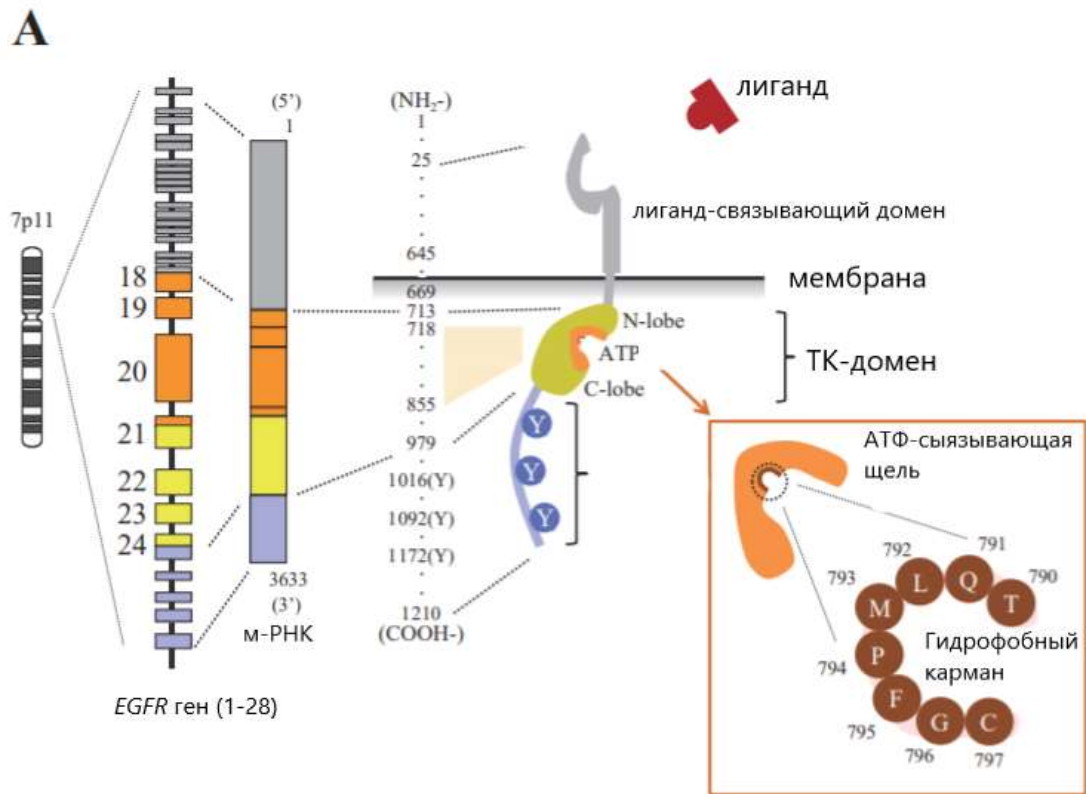


Рисунок 3 – Структурная организация белка EGFR

При связывании лиганда с внеклеточным доменом рецептора EGFR происходит активация его внутриклеточного тирозинкиназного домена за счет увеличения сродства с АТФ, при этом связывание АТФ и тирозинкиназного домена приводит к аутофосфорилированию остатков тирозина, что приводит к активации сигнальных путей, которые реализуют миграцию, рост клеток, уклонение от апоптоза, ангиогенез (Рисунок 4) [351].

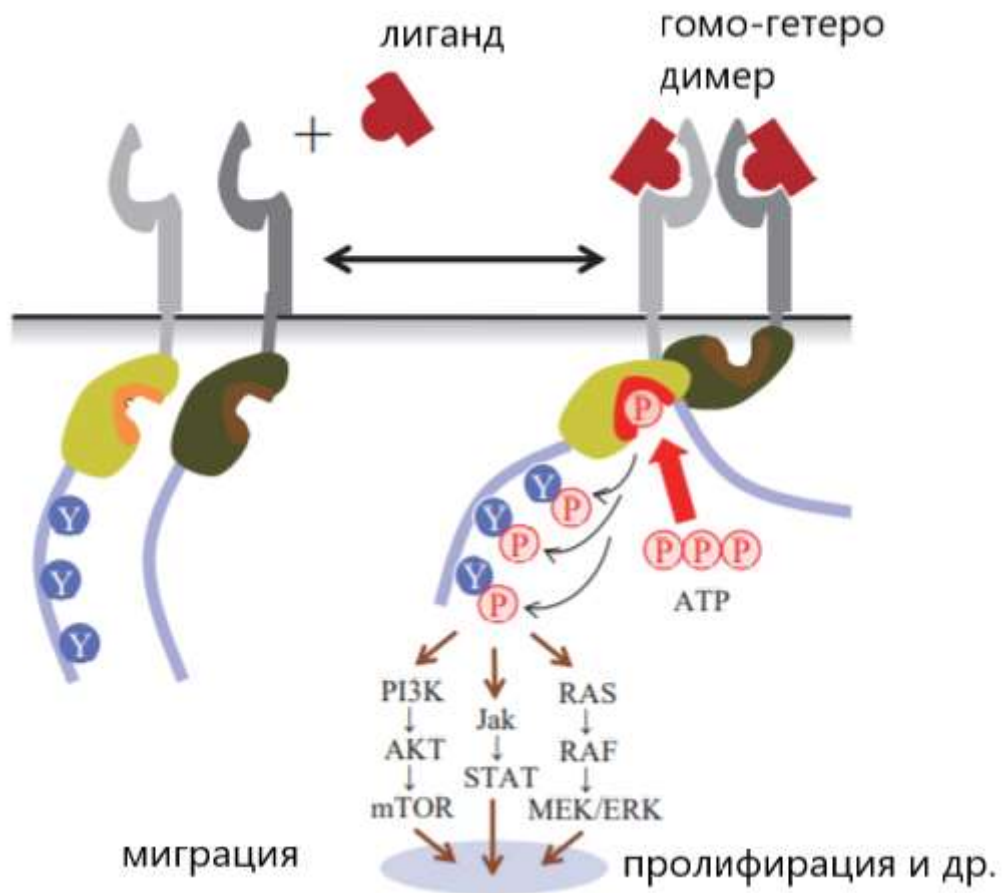


Рисунок 4 – Схема активации тирозин-киназного домена рецептора

В 2004 году были выявлены соматические мутации в экзонах 18–21 гена *EGFR*, которые вызывают лиганд-независимую активность тирозинкиназного домена рецептора *EGFR* и являются онкогенными. В 85 % случаев эти мутации представлены делецией в 19-м экзоне, вызывающей элиминацию нескольких аминокислотных последовательностей, включая лейцин в кодоне 747, аргинин в кодоне 748, глутаминовую кислоту в кодоне 749 и аланин в кодоне 750, кроме того, имеется вторая точечная мутация в экзоне 21, влияющая на замены лейцина на аргинин в кодоне L858R (Рисунок 5) [25, 255].

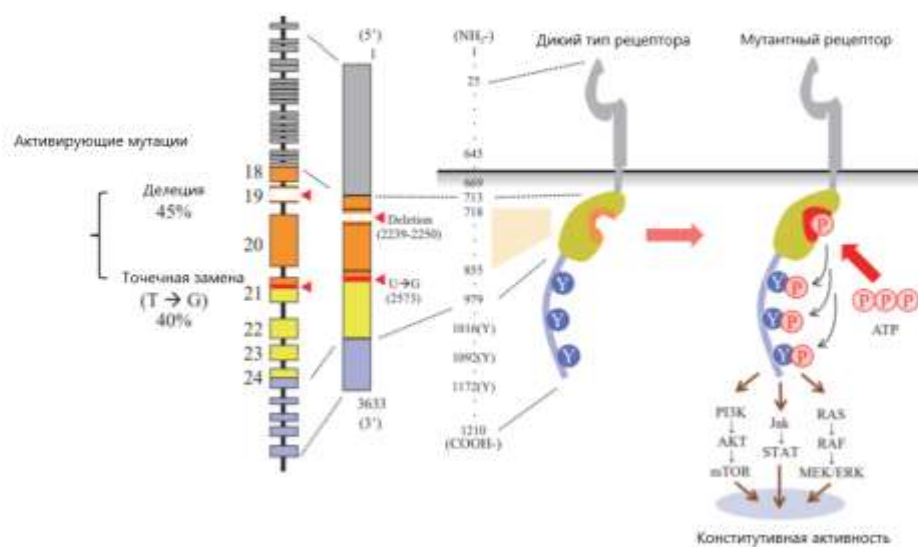


Рисунок 5 – Активирующие мутации в гене *EGFR*

Такие активирующие мутации приводят к тому, что мутированный рецептор *EGFR* постоянно активен в отсутствии лиганда, что способствует неконтролируемому прохождению митогенного сигнала и развитию/росту опухоли. Эти данные легли в основу создания таргетных лекарственных препаратов, которые конкурентно связываются с тирозинкиназным доменом вместо АТФ, тем самым предотвращая активацию сигнальных путей, подавляя рост опухоли. Более того мутированный рецептор имеет меньшую способность связываться с АТФ, чем дикий тип рецептора, что объясняет максимальную эффективность ингибиторов тирозинкиназ при лечении аденокарциномы легкого с наличием мутации в гене *EGFR* [225, 255, 317].

1.5 Ингибиторы тирозинкиназ разных поколений в лечении немелкоклеточного рака легкого

Открытие активирующих мутаций в гене рецептора эпидермального фактора роста и внедрение в клиническую практику ингибиторов тирозинкиназы

(ИТК) EGFR позволили изменить парадигму стратегии лечения НМРЛ, в частности аденокарциномы легкого. Для диссеминированного НМРЛ с наличием активирующей мутации в гене *EGFR* предпочтительно назначение ИТК EGFR, поскольку они обеспечивают более высокую выживаемость по сравнению с химиотерапией на основе платины [225, 351].

На сегодняшний день в арсенале клинического онколога имеются ИТК трех поколений (Рисунок 6) [170].

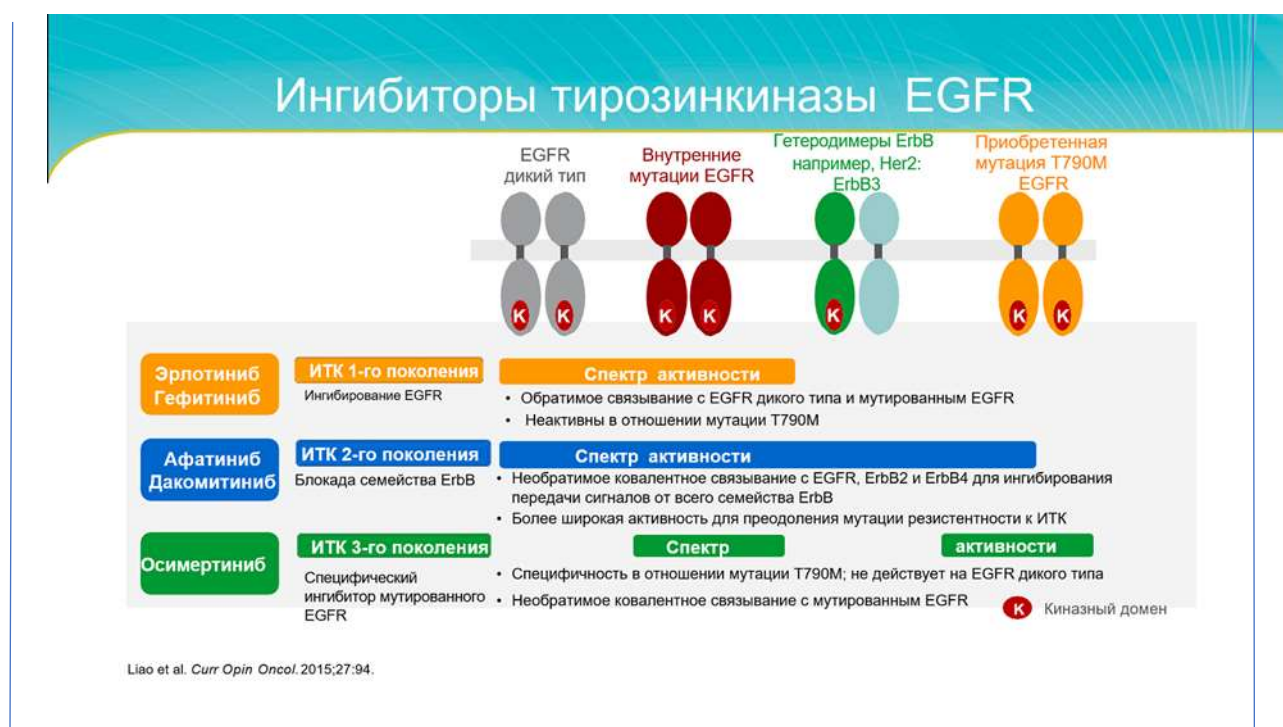


Рисунок 6 – Наименование ингибиторов тирозинкиназ EGFR разных поколений и их спектр активности

Гефитиниб – это первый одобренный ИТК EGFR, который обратимо конкурентно связывается с внутриклеточным доменом EGFR, блокируя проведение сигнала в ядро. В Азиатском исследовании IPASS была показана высокая частота объективных ответов (ЧОО) 71,2 % у пациентов с наличием мутации в EGFR, и 1,1 % у пациентов без таковой мутации [124, 125]. Вторым представителем первого поколения ИТК EGFR является эрлотиниб, который также обратимо и конкурентно связывается с внутриклеточным доменом EGFR. В

исследованиях OPTIMAL, CTONG-0802, EURTAC, IPASS применение эрлотиниба и гефитиниба у EGFR мутированных пациентов ассоциировалось с медианой выживаемости без прогрессирования (ВБП) 9,2–13,1 месяца, по сравнению с 4,6–6,3 месяца среди пациентов, получающих химиотерапию на основе препаратов платины [110, 111, 118]. Однако нужно отметить, что в исследовании IPASS для гефитиниба и в исследованиях OPTIMAL, CTONG-0802, EURTAC для эрлотиниба не было получено преимущества по общей выживаемости (ОВ) [253, 377].

В 2014 году были одобрены представители ИТК *EGFR* второго поколения афатиниб и дакомитиниб. Эти таргетные лекарственные препараты осуществляют необратимое ковалентное связывание с EGFR, ErbB2 и ErbB4 для ингибирования передачи сигналов от всего семейства ErbB. В исследовании LUX-Lung 3 афатиниб показал медиану ВБП для обеих мутаций (Del19/L858R) 13,6 месяца, по сравнению с 6,9 месяца для группы химиотерапии (цисплатин/пеметрексед) [266]. Эти показатели ВБП были также подтверждены в Азиатском исследовании LUX-Lung 6 и были не зависимы от возраста, пола и расы [29]. Более того афатиниб впервые показал преимущества по показателю ОВ у пациентов с делецией в 19 экзоне [30, 66]. Так в исследовании LUX-Lung 3 медиана ОВ для афатиниба составила 33,3 месяца против 21,1 месяца для химиотерапии ($p = 0,0015$). В исследовании LUX-Lung 6 медиана ОВ для афатиниба составила 31,4 месяца против 18,4 месяца для группы химиотерапии ($p = 0,023$) [30, 66]. Долгое время не проводилось прямого сравнения эффективности ИТК EGFR первого и второго поколения напрямую. В двух рандомизированных контролируемых исследованиях LUX-Lung 7 и ARCHER 1050 такое сравнение было проведено по трем основным конечным точкам: ВБП, ОВ и времени до окончания лечения. В исследовании LUX-Lung 7 афатиниб статистически значимо увеличивал медиану ВБП в сравнении с гефитинибом (11,0 против 10,9 месяца). Также в этом исследовании частота объективных ответов достигала 70 % в группе афатиниба и 56 % в группе гефитиниба, однако по показателю ОВ разница была статистически не достоверна

(27,9 месяца с афатинибом по сравнению с 24,5 месяца с гефитинибом; $p = 0,2580$) [84, 142]. С другой стороны, нужно отметить, что оба представителя ИТК второго поколения обладают худшей переносимостью по сравнению с ИТК первого поколения, что чаще всего проявляется в виде диареи и кожной токсичности. Такой профиль токсичности обусловлен активным связыванием с диким типом рецептора EGFR (Рисунок 7) [32].

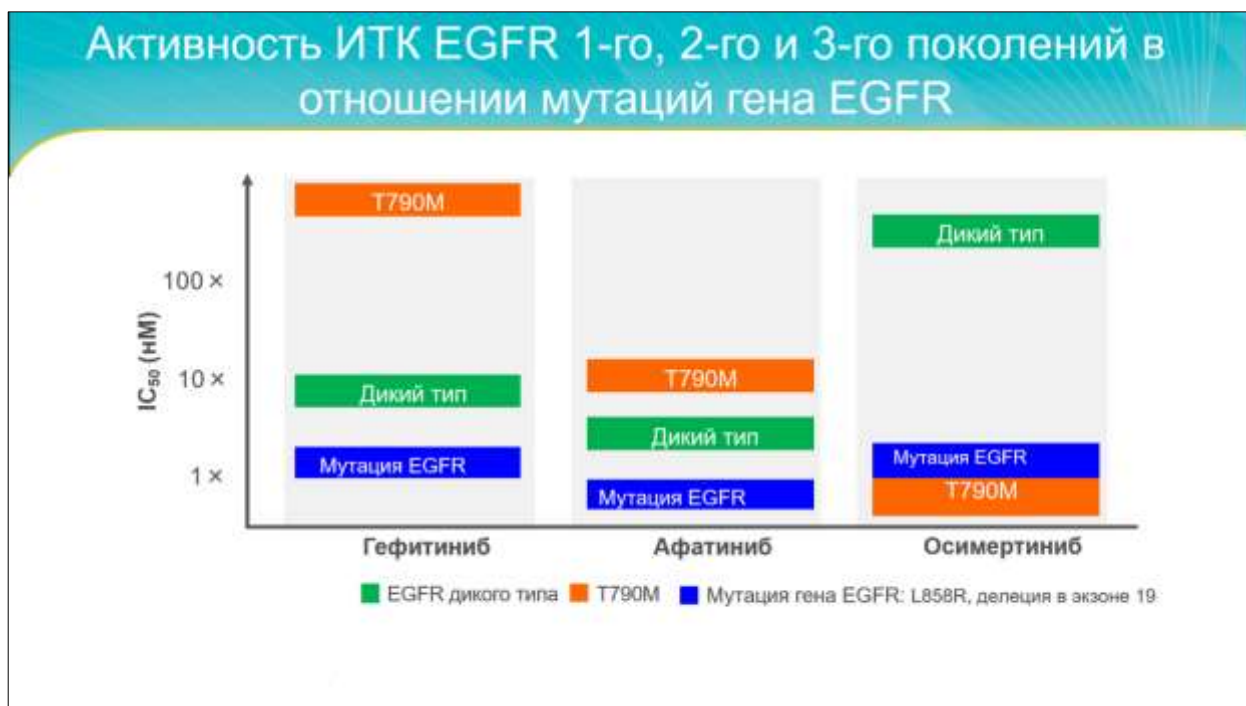


Рисунок 7 – Сравнительная характеристика активности ингибиторов тирозинкиназ разного поколения в отношении рецептора EGFR дикого и мутантного типа

Как уже упоминалось ранее, все мутации в гене *EGFR* при НМРЛ расположены в экзонах 18–21, и 85 % активирующих мутаций приходится на делецию в 19-м экзоне и точечную замену в 21-м экзоне. Однако, внедрение в клиническую практику современных методов молекулярной диагностики (секвенирование нового поколения – NGS) позволило выявлять более редкие мутации в этой части гена *EGFR*, в том числе в экзоне 18 и 20, что в свою очередь

вызывает интерес к изучению эффективности ИТК у этой когорты пациентов [75, 142, 165, 342].

Частота редких мутаций в гене *EGFR* достигает 10–12 %, но с учетом высокой заболеваемости РЛ во всем мире можно ожидать достаточно большого количества пациентов с такими мутациями и возможную эффективность таргетной терапии [63, 245, 317]. Редкие мутации очень гетерогенны и характеризуются вставками и/или точечными заменами в экзоне 20 (S768I), заменами в экзоне 18 (G719X, E790K/E790A), сложными мутациями (S768I + G719X), мутациями в 21-м экзоне (L861Q) (Рисунок 8) [68, 70, 147].

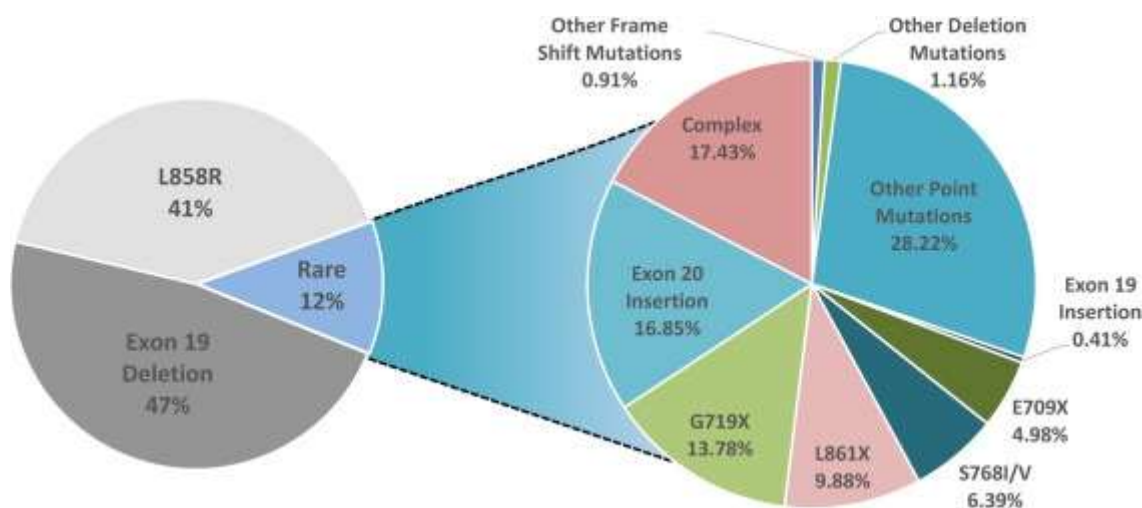


Рисунок 8 – Спектр редких мутаций в гене *EGFR* [146]

Интересно, что частые и редкие мутации могут встречаться, как изолированно, так и в сочетании. Сочетание частых мутаций с редкими характеризуются лучшим ответом на лечение ИТК, в отличие от пациентов с комбинацией только редких мутаций [28, 33, 145, 251, 357].

Данные об эффективности ИТК у пациентов с редкими мутациями *EGFR* ограничены, обзор исследований на эту тему представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Обзор исследований с оценкой эффективности ингибиторов тирозинкиназ разного поколения у пациентов с редкими мутациями *EGFR*

| Исследование | Тип | Лечение | N | ЧОО (%) | ВБП (мес.) | ОВ (мес.) |
|-----------------|---|--------------------------------------|----|---------|------------|-----------|
| Yang et al. | Post Hoc анализ Lux Lung 2, 3, 6 | афатиниб | 38 | 71,1 | 10,7 | 19,4 |
| Baek et al. | ретроспективный анализ | эрлотиниб, гефитиниб | 54 | 20,4 | 2,6 | 12,7 |
| Chiu et al. | ретроспективный анализ | эрлотиниб, гефитиниб | 13 | 38,5 | 3,9 | 17,4 |
| Arrieta et al. | наблюдательное проспективное когортное | эрлотиниб, гефитиниб, афатиниб | 38 | 32,4 | 3,9 | 17,4 |
| Watanabe et al. | Post Hoc анализ NEJ002 | гефитиниб | 10 | 20 | 2,2 | 11,9 |
| Lohinae et al. | ретроспективный анализ | эрлотиниб, гефитиниб | 49 | 37 | 6,2 | 7,4 |

Как видно из таблицы 3, на основании данных объединенного анализа трех клинических исследований (LUX-Lung 2, LUX-Lung 3 и LUX-Lung 6) были получены наилучшие результаты терапии афатинибом по показателям частоты объективных ответов, ВБП и ОВ у пациентов с наиболее часто встречающимися редкими мутациями G719X (3 %), S768I (1 %), L861Q (1–3 %), что послужило поводом для одобрения FDA в 2018 году афатиниба для лечения пациентов с наличием редких точечных мутаций в гене *EGFR* [66, 106, 293].

Применение ингибиторов тирозинкиназы EGFR второго поколения после прогрессирования на ИТК первого поколения показало низкую эффективность, и частота объективных ответов не превысила 10 % [145]. В экспериментальных исследованиях была показана активность афатиниба и дакомитинаба в отношении мутации резистентности T790M, однако требуемая концентрация препарат в плазме для достижения клинического эффекта очень высока, что вызывает непереносимую токсичность (см. рисунок 7) [157].

Не смотря на доказанное преимущество эффективности ИТК первого и второго поколения в сравнении с химиотерапией, в среднем в течение 10–14 месяцев от начала лечения развивается резистентность к данной таргетной терапии. В подавляющем большинстве случаев (50–70 %) эта резистентность обусловлена развитием повторной мутации T790M, суть этого феномена заключается в появлении второй мутации в экзоне 20-го гена *EGFR*, влияющей на замену треонина (Т) на метионин (М) по кодону 790 [351]. Надо отметить, что мутация T790M это и не единственный механизм развития устойчивости к ИТК первого и второго поколения (Рисунок 9) [133].

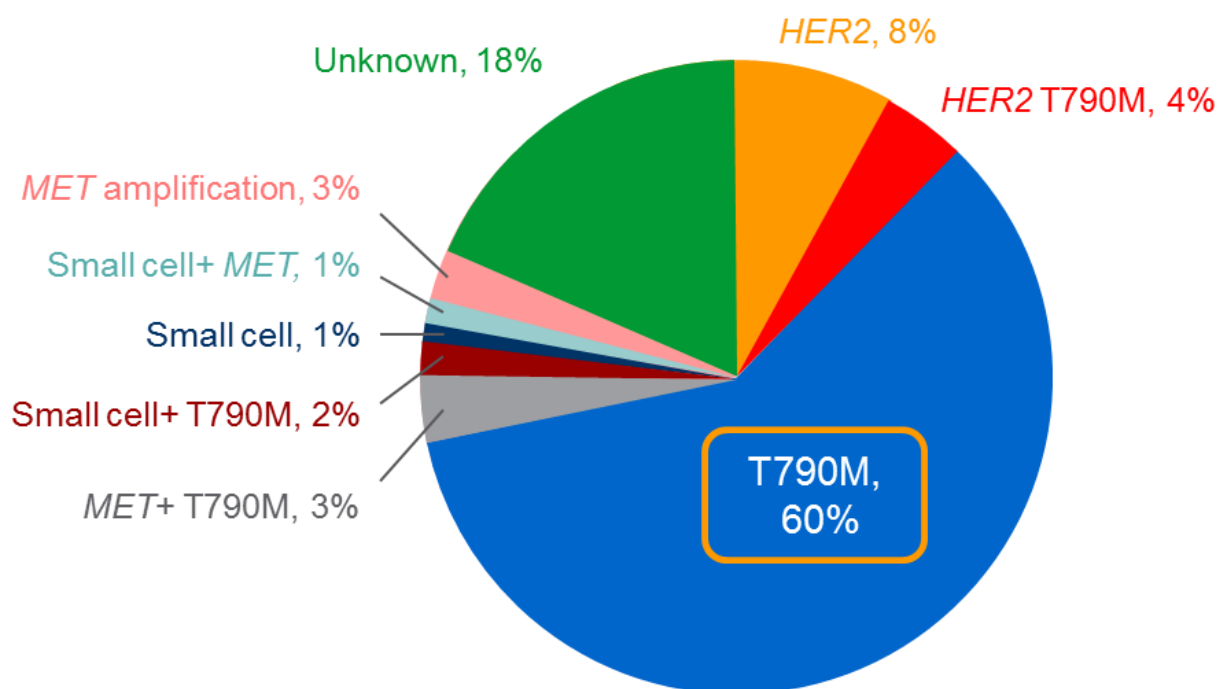


Рисунок 9 – Различные механизмы развития резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназы первого и второго поколения [133]

Ингибиторы тирозинкиназы EGFR третьего поколения имеют активность в отношении мутации T790M [256]. Представителем этой группы ИТК, является осимертиниб (тагриссо). Осимертиниб – это необратимый ИТК, который ковалентно связывается с мутантным EGFR, практически не связывается с диким типом EGFR, что обуславливает его благоприятный профиль токсичности. Более

того, осимертиниб обладает высокой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, что реализуется в его терапевтической эффективности в отношении метастазов в головной мозг, а также их профилактики. В исследованиях AURA, AURA 2, AURA 3 была показана эффективность осимертиниба у пациентов, которые получали ИТК первого и второго поколения с развитием резистентности по средству мутации T790M [133, 245, 315]. В исследовании AURA частота объективных ответов составила 61 % и медиана ВБП 9,6 месяца, тогда как в исследовании AURA 2, частота объективных ответов – 62 %, ВБП – 12,3 месяца [246]. В исследовании III фазы AURA 3 сравнивалась эффективность осимертиниба с химиотерапией (платина, пеметрексед) у пациентов с мутацией T790M. В результате этого исследования показатели ВБП составили 10,1 месяца для таргетной терапии и всего 4,4 месяца для химиотерапии, более того, частота объективных ответов 71 % против 31 % соответственно [248, 275, 344].

В связи с полученными данными об эффективности осимертиниба во второй линии терапии у пациентов с мутацией T790M, возникает вопрос получения повторного биопсионного материала для определения этой мутации. К сожалению, у данной категории пациентов не всегда есть техническая возможность выполнения биопсии из-за недоступности опухоли, или процедура может быть сопряжена с высоким риском осложнений. В том случае, когда выполнить повторную биопсию все же удастся, она может быть не информативна с частотой 5–10 % даже при наличии достаточного количества материала [245, 249]. С учетом наличия трудностей с повторной биопсией появился интерес к неинвазивным методам генотипирования путем анализа внеклеточной ДНК в плазме [173]. В исследовании AURA конкордантность между наличием мутации T790M в опухоли и плазме составила 70 % [102, 249]. Таким образом, в реальной клинической практике при возникновении опухолевой прогрессии на ИТК 1-го и 2-го поколений для поиска мутации резистентности T790M первым этапом исследуется плазма на наличие циркулирующей опухолевой ДНК, в случае положительного результата назначается осимертиниб, в случае отрицательного

результата необходимо рассмотреть возможность повторной тканевой биопсии опухоли или метастатического очага [107, 132, 133, 173].

После того как ИТК 3-го поколения показали свою эффективность в отношении мутации T790M во второй линии терапии, стартовали исследования по изучению активности осимертиниба в первой линии. В исследовании FLAURA в 2017 году были получены данные эффективности осимертиниба в первой линии терапии EGFR позитивного РЛ в сравнении с ИТК первого поколения [247]. Первичная конечная точка была ВВП и составила для осимертиниба 18,9 месяца в сравнении с ИТК первого поколения 10,2 месяца [247]. Более того в этом исследовании удалось зафиксировать преимущества осимертиниба и по показателю ОВ, медиана ОВ для осимертиниба составила 38,6 месяца в группе сравнения 31,8 месяца [247, 254]. Однако надо отметить, что в группе сравнения в исследовании FLAURA были только ИТК первого поколения (гефитиниб и эрлотиниб) и в настоящее время нет сравнительных данных между ИТК 2-го поколения и ИТК 3-го поколения. Более того, в клинической практике существует дилемма выбора между двумя подходами терапии EGFR позитивного РЛ. Первый вариант начинать лечение с самого эффективного ИТК 3-го поколения с показателем ВВП 18,9 месяца и второй вариант последовательной терапии, начиная с ИТК первого или второго поколения с показателями ВВП 9,2–13,6 месяца и при возникновении мутации резистентности T790M переходить на ИТК 3-го поколения с показателями ВВП 10,1 месяца. При обоих вариантах лечения есть свои преимущества и недостатки, поэтому оптимальный выбор таргетной терапии EGFR позитивного РЛ определяется на мультидисциплинарном консилиуме с учетом всех клинических данных [133, 136, 250, 362, 372].

1.6 Роль иммунного контроля в канцерогенезе легкого

Дерегуляция иммунной системы у пациентов со злокачественными опухолями легкого является важным признаком в патогенезе этого заболевания.

Распространенность рака легкого во всем мире и лидирующие позиции в структуре смертности среди злокачественных новообразований, привело к тому, что рак легкого является одним из наиболее изученных видов рака в иммуноонкологии [160].

Очевидно, что в идеале иммунная система может отслеживать, распознавать и уничтожать злокачественные клетки. Однако опухоль имеет ряд механизмов ускользания от иммунного надзора организма. В основе неспособности организма элиминировать опухолевые клетки лежит как снижение функциональной активности антиген-презентирующих клеток, так и иммуносупрессирующий эффект самой опухоли (усиление иммуносупрессивного окружения опухоли, активация тормозных иммунных контрольных точек и др.) [72, 93, 141].

Одним из механизмов контроля гомеостаза иммунной системой является распознавание чужеродного антигена, в том числе и опухолевых антигенов. Известно несколько вида опухолевых антигенов. Одна группа, это антигены, ассоциированные с опухолью, которые сверхэкспрессируются на клетках злокачественной опухоли, но также могут быть обнаружены в нормальных тканях, к ним относятся CD19, PRAME, MAGE, ERBB2, p53 и L2A5. Исследования показали, что опухоли с таким набором антигенов могут быть устойчивы к лечению ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [109, 154, 316, 332]. Другая группа антигенов называется опухолеспецифическими антигенами. Они часто уникальны для опухоли и возникают в результате накопления мутаций в линии опухолевых клеток, их также называют неоантигенами. Неоантигены часто обладают низкой иммуногенностью и не распознаются иммунокомпетентными клетками организма [162, 242, 363].

В осуществлении противоопухолевого иммунного ответа одну из ключевых ролей отводят антигенпрезентирующим клеткам (АПК). Дендритные клетки (ДК) – уникальные клетки среди всех АПК, а их первичная функция заключается в презентации антигена Т-клеткам и запуске адаптивного иммунного ответа. Дендритные клетки созревают из циркулирующих предшественников, которые формируются в костном мозге, завершение созревания ДК происходит в

периферических лимфоидных органах. Незрелые ДК характеризуются высокой способностью захватывать антигены путем фагоцитоза, макропиноцитоза или эндоцитоза с участием Fc-R рецепторов, C-лектиновых рецепторов и интегринов [207, 243, 339]. Пусковым фактором к созреванию ДК могут быть различные стимулы, такие как бактерии, вирусы, повреждение тканей, а также опухолевые антигены. В свою очередь активированные ДК обладают пониженной способностью к захвату антигена, повышенной экспрессией главного комплекса гистосовместимости II типа (МНС II), ко-стимулирующих молекул и рецептора хемокина СС типа 7 (CCR7), высокой способностью продуцировать цитокины и активной миграцией в дренирующие лимфатические узлы, где, собственно, и происходит индукция Т-клеточного ответа [243].

При рассмотрении роли ДК в узком аспекте формирования противоопухолевого иммунитета можно представить несколько механизмов такой защиты. В процессе роста злокачественной опухоли постоянно происходит частичная гибель клеток, которые могут попадать в системный кровоток, где захватываются ДК, после чего происходит процессирование опухолевых антигенов и презентация Т-лимфоцитам. Этот факт может играть важную роль в формировании естественной эндогенной противоопухолевой иммунизации [16, 87]. Кроме того, ДК обладают рядом дополнительных механизмов представления антигена в комплексе не только с МНС II класса, но и МНС I класса, что является мощным активатором цитотоксических Т-лимфоцитов, которые способны инактивировать опухолевые клетки. Это так называемое перекрестное представление, позволяющее активировать как CD4+, так и CD8+ лимфоциты, что реализуется в мощной клональной экспансии и дифференциации эффекторных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов памяти [146, 243].

Известно, что ДК способны стимулировать наивные В-лимфоциты и В-лимфоциты памяти, NK-клетки и NKT-клетки. Таким образом, ДК участвуют в элиминации опухолевых клеток, направляя как эффекторы специфического иммунитета (цитотоксические Т-лимфоциты), так и эффекторы неспецифической цитотоксичности (NK-клетки или NKT-клетки) на соответствующие мишени.

В недавних исследованиях также показана еще одна способность ДК выступать в качестве эффекторных клеток и осуществлять прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Эта способность реализуется за счет активации рецептора программированной смерти (PD-1), выделения перфоринов, гранзима В [233, 243].

Однако, не смотря на уникальные способности иммунной системы и, в частности ДК, элиминировать опухолевые клетки, часто злокачественная трансформация тканей все же происходит за счет ряда механизмов ускользания от иммунного надзора. Известно, что ассоциированные с опухолью ДК дефектны в своей дифференцировке и активации, являясь плохими стимуляторами иммунных ответов. Доказано, что гипоксия, накопление аденозина, повышенный уровень лактата и снижение рН, связанные с опухолью, нарушают нормальную функцию ДК. Кроме того, накопление интерлейкина 10 (ИЛ-10) ингибирует выработку ИЛ-12 за счет инфильтрации опухоли CD103 + CD11b, что изменяет способность ДК вызывать антигенспецифические Т-клеточные ответы [318, 352, 365]. Известен и другой механизм ослабления работы ДК в увеличении экспрессии в злокачественных опухолях лиганда PD-L1. Блокирование этого лиганда приводит к увеличению продукции TNF α , ИЛ-12, ИЛ-1 β и усилению способности ДК к стимуляции Т-клеток, что лежит в основе современной противоопухолевой терапии. Некоторые исследования показали, что накопление липидов в ДК также приводит к их дисфункции [171, 365]. Интересны данные, говорящие о том, что ДК, проникшие в опухоль, трансформируются в иммуносупрессивные регуляторные клетки, такие ДК с супрессивным фенотипом продуцируют опухолевый ИЛ-6 и иммунодепрессивный галектин-1. Проникающие в опухоль ДК сверхэкспрессируют несколько генов, регулирующих их иммуносупрессивные функции. Было обнаружено, что STAT3 активируется в опухолевых ДК и индуцирует S100A9, который предотвращает полное созревание ДК, блокируя их реакцию на местные сигналы тревоги [310]. В дополнение ко всему сказанному ДК могут сверхэкспрессировать фактор транскрипции FOXO3, который управляет экспрессией индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), аргиназы и TGF- β и подавляет экспрессию ко-стимулирующих молекул (Рисунок 10) [20, 88, 365].

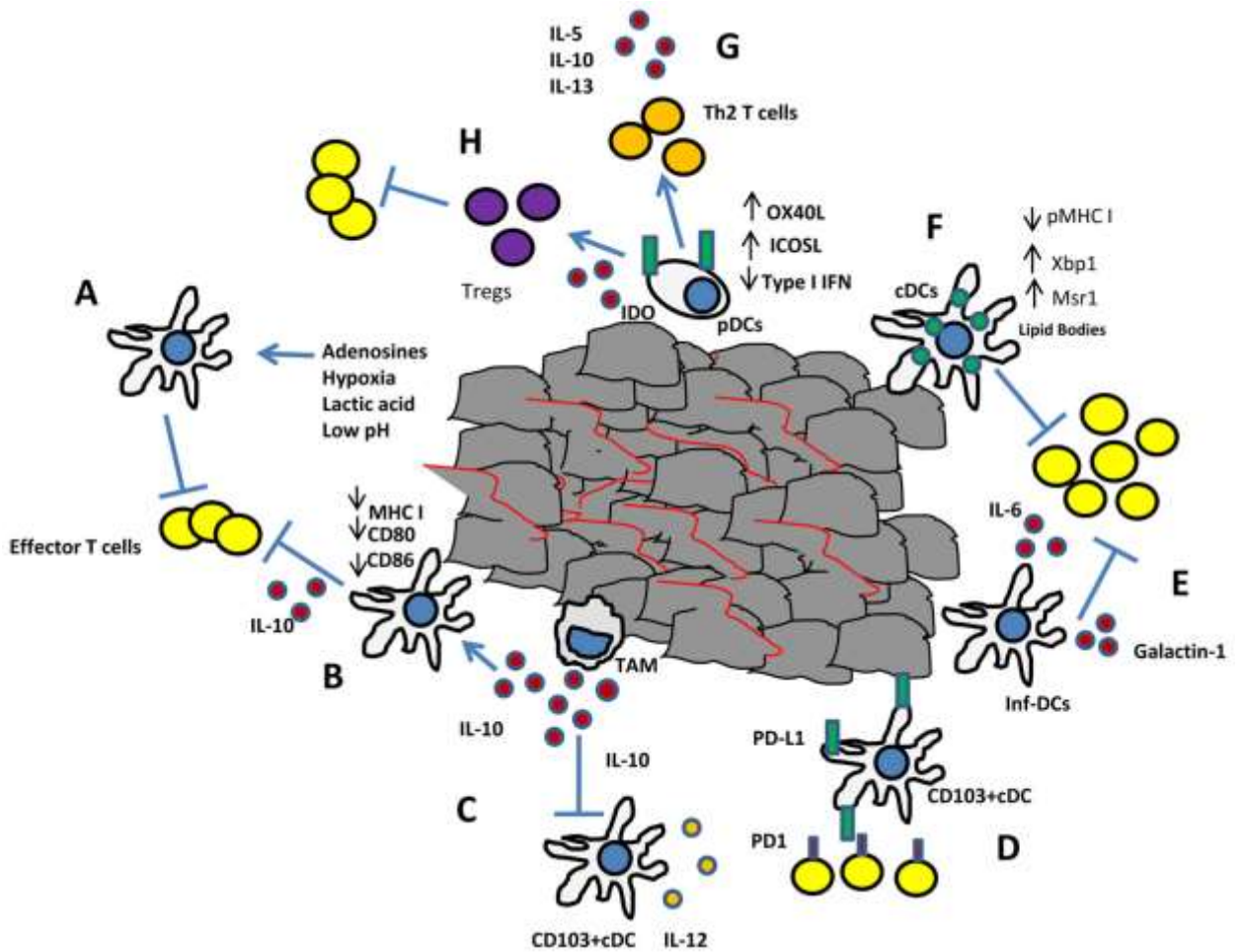


Рисунок 10 – Механизмы дисфункции дендритной клетки при раке [365]

Таким образом, на примере ДК рассмотрены различные механизмы ускользания опухоли от иммунного надзора, в связи с чем интересны исследования в области создания противораковых вакцин, основанных на активации ДК на конкретный опухолевый антиген *in vitro* с последующим введением активных ДК пациенту. В этой сфере, безусловно, есть множество трудностей и барьеров, однако этот подход остается одним из перспективных в разработке новых вариантов противоопухолевой терапии [88, 294].

1.7 Роль арил-углеводородного рецептора в канцерогенезе легкого, механизм токсического действия бензо(а)пирена

Арил-углеводородный рецептор (AhR) входит в состав семейства транскрипционных факторов, названных «helix-loop-helix/PAS», т. е. спираль-петля-спираль и состоит из трех функциональных частей: мотив спираль-петля-спираль, домен PAS (А и В) и Q-домен богатый глутамином (Рисунок 11) [234].

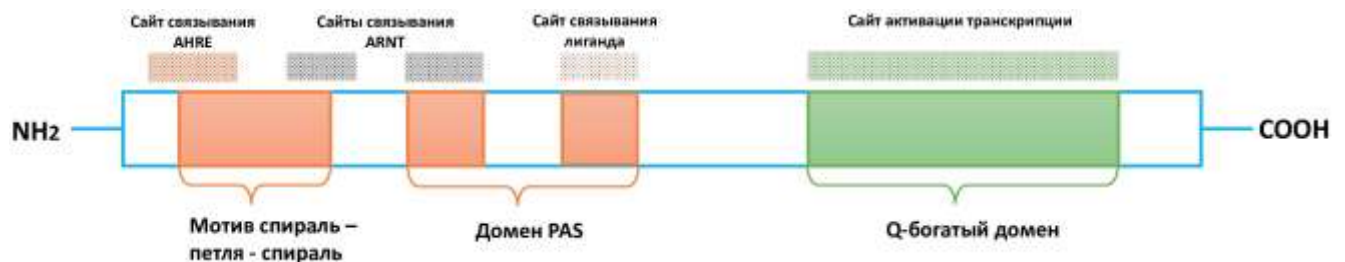


Рисунок 11 – Функциональная структура AhR

Активация AhR может осуществляться за счет экзогенных и эндогенным лигандов. К экзогенным лигандам относятся ПАУ; пищевые фитохимические соединения, например, индол-3-карбинол и индолы, продуцируемые микробиотой; флавоноиды, такие как кверцетин и ресвератрол, являющиеся наиболее распространенным классом полифенолов, содержащиеся во фруктах и овощах [35, 40, 230, 311]. Среди эндогенных лигандов можно выделить эйкозаноиды, например липоксин А₄, билирубин, метаболиты триптофана: 6-формилиндоло[3,2-*b*]карбазол и кинуренин (Kyn) [298, 311].

Наивысший уровень экспрессии AhR регистрируется в плаценте человека, несколько ниже уровень экспрессии этого рецептора определяется в легких, сердце, поджелудочной железе и печени, тогда как в почках, головном мозге и скелетных мышцах он экспрессируется на низком уровне [381].

Постоянная хроническая активация AhR канцерогенами, содержащимися в табачном дыме, например, бензо(а)пиреном приводит к чрезмерной активации нескольких сигнальных путей, что в свою очередь может запускать ряд каскадов

канцерогенеза, приводящих к развитию рака легкого. В свою очередь, различают геномный и негеномный путь регуляции сигнальных путей [34, 309].

Рассмотрим геномный путь активации на примере бензо(а)пирена. Бензо(а)пирен, $C_{20}H_{12}$, относящийся к классу полициклических ароматических углеводородов, на сегодня является широко распространенным загрязнителем окружающей среды. Он попадает в атмосферу различными путями, особенный вклад вносит антропогенная деятельность человека (выхлопные газы автомобилей, выбросы предприятий, продукты сгорания различных видов топлива и др.). Еще одним источником БП является табачный дым [309]. Многочисленные токсикологические исследования на животных моделях и клеточных культурах человека показали, что этот ПАУ обладает ярко выраженным канцерогенным действием, а также вызывает иммуносупрессию, тератогенные эффекты и гормональные нарушения. Согласно данным IARC, БП относится к канцерогенам I группы, т. е. может вызывать рак у человека. Формула БП представлена на рисунке 12.

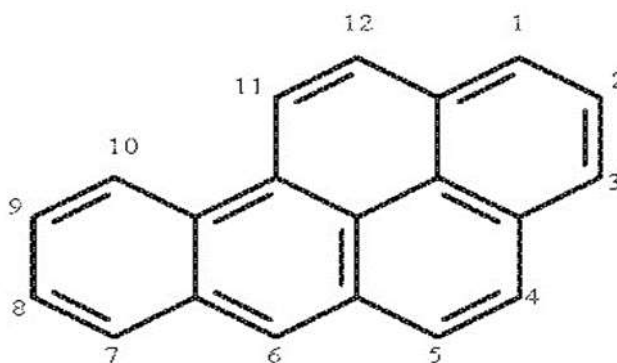


Рисунок 12 – Структурная формула бензо(а)пирена

На сегодняшний день установлено, что токсическое действие БП может осуществляться по двум основным механизмам: генотоксическому и негенотоксическому или эпигенетическому. Генотоксические основы его токсического действия изучены к настоящему времени достаточно хорошо. Известно, что электрофильные метаболиты БП, образовавшиеся в результате

окисления CYP1A2 и CYP1B1 изоформами цитохромами P450, ковалентно связываются с ДНК с образованием аддуктов и, вызывая ее прямое повреждение, с последующим развитием соматических мутаций в ключевых генах-мишенях (*TP53*, *KRAS*). Однако, в современных исследованиях все больший интерес представляют эпигенетические механизмы канцерогенеза и, в частности, канцерогенеза легкого. В этом контексте интересно рассмотреть два пути метаболизма ксенобиотиков с участием AhR такие как классический (канонический) и неканонический путь (Рисунок 13). В физиологических условиях AhR локализуется в цитозоле и образует комплекс со специфическими белками, состоящий из димеров Hsp90, простогландин-Е-синтазы (PTGES3), одной молекулы X-ассоциированного белка 2 вируса гепатита В (XAP2), белка тирозинкиназы c-Src [228, 257, 322]. После связывания с лигандом AhR меняет свою конформацию и перемещается в ядро, где в классическом варианте димеризуется с ядерным переносчиком AhR (ARNT). Комплекс AhR-ARNT связывается в ДНК с элементами ответа на ксенобиотики (*XRE*) или элементами диоксинового ответа (*DRE*), что инициирует транскрипцию нескольких генов-мишеней из семейства цитохрома *P450* (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*) [115, 234, 287]. Такая активация приводит к большому спектры физиологических и токсических эффектов. Известно, что CYP1A1, окисляя ПАУ, играет важную роль в активации канцерогенов с образованием высоко реакционноспособных эпоксидов в легких [80]. Ряд исследований показывают связь полиморфных вариантов гена *CYP1A1*, а именно: аллельные варианты *CYP1A1* * 3 (T3205C) и *CYP1A1* * 4 (Thr461Asn) с повышенной активностью фермента, приводящей к увеличению образования ДНК-аддуктов и, как следствие, к РЛ [80, 126]. Различные варианты одного и того же аллеля проявляются в определенных подтипах РЛ. Например, показана связь аллеля *CYP1A1* * 4 (Thr461Asn) с риском развития мелкоклеточного РЛ, в испанской популяции также имеются данные о связи аллелей *CYP1A1* * 2A (3801T → C) и *CYP1A1* * 2C (2455A → G) с НМРЛ [80, 91, 126].

CYP1A2 способен активировать проканцерогены сигаретного дыма. Аллели *CYP1A2* * 1D и *CYP1A2* * 1F ассоциируются с плоскоклеточным РЛ [268]. Имеются различные данные относительно аллельного варианта *CYP1A2* (163С → А). В одном из исследований показана его связь с аденокарциномой у курящих [81], а в метаанализе 2013 года аллельный вариант *CYP1A2* (163С → А) связывают с риском плоскоклеточного РЛ у европеоидной расы [196].

После индукции транскрипции генов-мишеней, AhR диссоциирует от ARNT и перемещается обратно в цитоплазму, где расщепляется 26S-убиквитин-протеасомной системой [323]. Активация AhR также инициирует транскрипцию репрессора AhR (AhRR), который функционирует как негативный регулятор активности AhR. В дополнение к AhRR, ТХДД-индуцируемая (2, 3, 7, 8 тетрахлориди-бензо-р-диоксин) поли-АДФ-рибозная полимераз, является еще одним модулятором экспрессии AhR, который функционирует отрицательно [370].

В неканоническом пути регуляции транскрипции активированный лигандом AhR гетеродимеризуется с белками-партнерами, отличными от ARNT, например, Krüppel-подобным фактором 6 (KLF6) или RelB, который является одним из белков семейства ядерного фактора каппа В (NF-κB) (Рисунок 13) [137, 166, 228, 234].

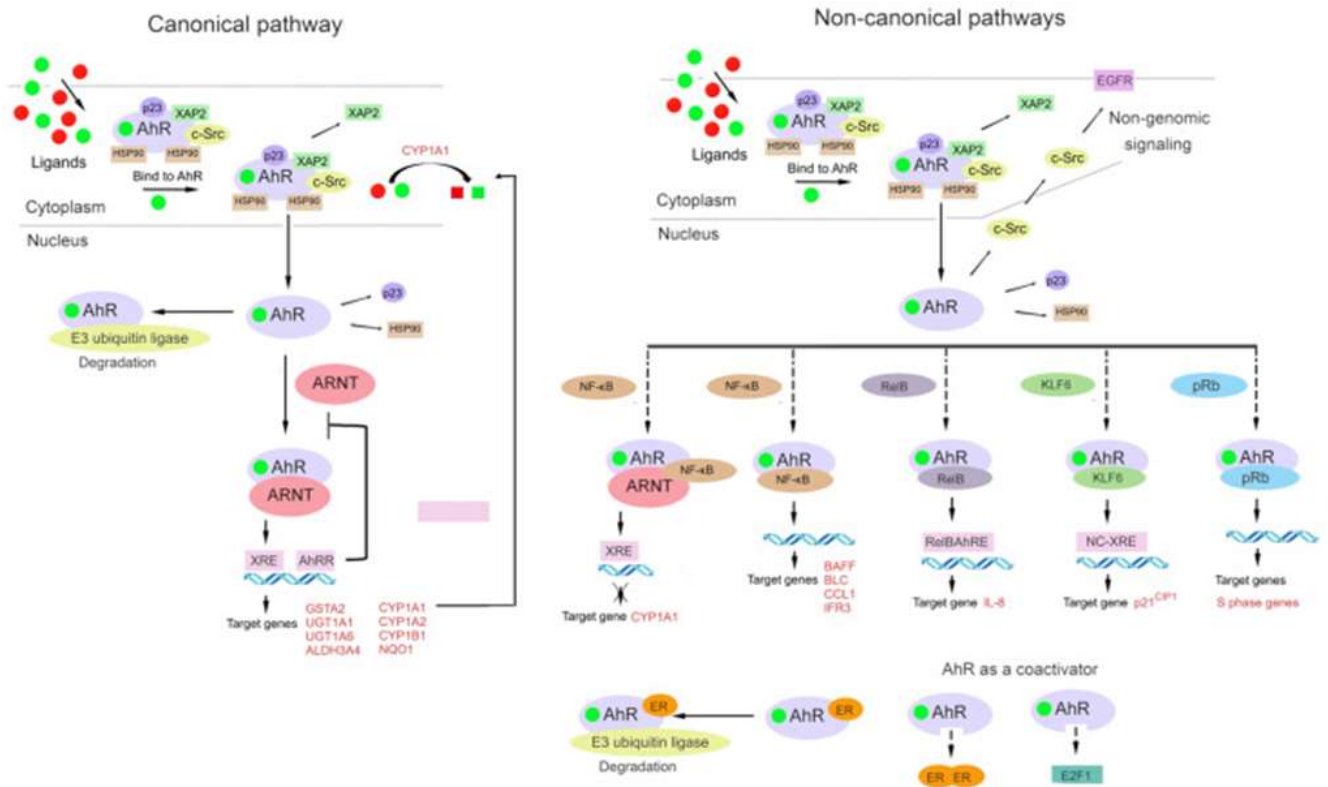


Рисунок 13 – Схема канонических и неканонических сигнальных путей AhR
(взято из Grishanova A.Y., 2022)

Через взаимодействие AhR с белками RelA или RelB (белки семейства NF-κB) может происходить активация NF-κB [55, 376]. Образовавшийся гетеродимер AhR-NF-κB приводит к индукции экспрессии цитокинов и хемокинов, фактора активации В-клеток семейства факторов некроза опухоли (BAFF), хемоаттрактанта В-лимфоцитов (BLC), СС-хемокинового лиганда 1 (CCL1) и интерферон-чувствительного фактора (IFR3) [50, 137].

Кроме того, AhR имеет перекрестные пути передачи сигнала с Nrf2 (фактор-2, связанный с эритроидным ядерным фактором), который является ключевым фактором транскрипции, ответственным за антиоксидантную защиту во многих тканях и клетках, включая альвеолярный эпителий, эндотелий и макрофаги, помимо этого функции Nrf2 охватывают множество клеточных процессов, включая регуляцию выживания клеток, метаболический и белковый гомеостаз, воспаление, пролиферацию и дифференцировку клеток [115, 122]. В основе

активации Nrf2 с помощью AhR может лежать несколько механизмов. С одной стороны Nrf2 выступает как ген-мишень AhR, а с другой стороны возможна непрямая активация Nrf2 через активные формы кислорода, генерируемые CYP1A1, что приводит к окислению Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1) и высвобождению Nrf2 из его комплекса [42, 137]. Наконец возможен прямой перекрест между сигнальными путями AhR и Nrf2, т. к. они координируют регуляцию экспрессии генов метаболизма ксенобиотиков II фазы *GSTA2*, *UGT1A6* и *NQO1*. Показано, что в регуляторной области гена *NQO1* в непосредственной близости находится XRE для AhR и ARE (антиоксидант-ответственный элемент) для Nrf2 [49, 137, 258, 359].

Существуют и другие перекрестные сигнальные пути с AhR, например, передача сигналов AhR связана с активностью и функцией рецептора эстрогена [137, 138], для которых активированный AhR может служить коактиватором [228, 232]. Кроме того, комплекс лиганд-AhR может функционировать как коактиватор фактора связывания промотора E2 1 (E2F1): фактора транскрипции, который имеет решающее значение для перехода клеточного цикла из фазы G1 в фазу S [159, 228]. Связывание AhR с активной формой белка-супрессора опухоли ретинобластомы (pRb) приводит к остановке роста клеток в фазе G1/S клеточного цикла [44].

Помимо геномной передачи сигналов через гены-мишени, в недавних исследованиях были изучены несколько негеномных путей активации сигнальных путей по средствам AhR [22, 166, 331]. Например, при связывании лиганда с цитозольным комплексом AhR с шаперонами может высвобождаться c-Src-киназа, которая перемещается на плазматическую мембрану и активирует там рецептор *EGFR*, что приводит в свою очередь к усилению активности MAP-киназного сигнального пути с усилением пролиферации, миграции клеток и ухода от апоптоза. Активация этого сигнального пути лежит в основе одного из механизмов канцерогенеза легкого [25, 139, 255].

Другой негеномный путь основан на взаимодействии ТХДД и AhR после чего наблюдается быстрое увеличение внутриклеточной концентрации кальция

(как от внеклеточного, так и от эндоплазматического ретикулума). Помимо этого, ТХДД также приводит к функциональной активации Src-киназы за счет высвобождения ее из комплекса AhR, что сопровождается активацией киназы фокальной адгезии и модификацией адгезионных свойств клетки через нарушение фокальных точек адгезии [35, 325]. Активация Src-киназы также очень быстро может сопровождаться активацией киназ ERK1 и ERK2. Оба эти процесса могут усиливать друг друга для регулирования патофизиологических процессов воспаления. Действительно, приток кальция вызывает активацию протеинкиназы C (PKCa), которая фосфорилирует сериновый остаток цитозольного фермента фосфолипазы A2 (cPLA2) с последующим образованием арахидоновой кислоты. Параллельная активация MAP-киназ с помощью Src приводит к транскрипции циклооксигеназы 2 (COX2), которая использует арахидоновую кислоту для производства простагландинов, которые могут вызывать воспаление. Таким образом, эти два сигнальных пути, изначально активированные ТХДД, сходятся в сторону стимуляции воспаления [35]. Более того, AhR взаимодействует с Wnt/ β -катенином, эстрогеновым рецептором альфа или NF- κ B и сильно модулирует их действие [35, 36]. С другой стороны, эти факторы транскрипции также влияют на передачу сигналов AhR. Например, в настоящее время β -катенин описан как ко-активатор этого рецептора [77].

В дополнение ко всему нужно отметить широкий спектр функций AhR, он контролирует иммунные, воспалительные, гомеостатические и токсические ответы клетки на эндогенные и экзогенные воздействия. Может отвечать за дифференцировку субпопуляций T- и B-лимфоцитов, активировать продукцию провоспалительных цитокинов, регулировать экспрессию транскрипционных факторов STAT3 и NF- κ B, модулировать ответ на микробные, вирусные патогены, а также участвовать в метаболизме и биоактивации ксенобиотиков [298]. В результате регуляции дифференцировки T-клеток AhR играет важную роль в патогенезе хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и астме. AhR увеличивает продукцию муцина в клеточной линии NCI-H292 при хроническом бронхите [48].

В последнее время появились сообщения о том, что многие ксенобиотики, могут влиять на экспрессию микроРНК и в этом процессе одну из ключевых ролей играет AhR, который может активировать гены-мишени, имеющие *DRE*-элементы – сайты связывания в том числе те, которые содержат в своих интронах микроРНК (внутри-генные микроРНК), а также меж-генные микроРНК, имеющие собственный промотор с *DRE* элементом [46, 74, 332]. С помощью методов *in silico* был проведен поиск таких элементов связывания в геномах крыс, мышей, человека, и найдено 154 гена с *DRE* в геноме человека [175, 326, 252]. Так было показано, что при длительном воздействии БП экспрессия микроРНК-22, -29а, -126а, -193b значительно повышалась в легких самцов крыс, в то время как уровень микроРНК-483 увеличивался у самок. Исходя из данных исследований, было предположено, что в основе зависимых от пола эпигенетических эффектов БП может лежать различная экспрессия микроРНК, потенциально регулируемых AhR [2].

Усиление экспрессии некоторых микроРНК может приводить к изменению активности в работе их генов мишеней, например, подавления гена *PTEN*, белковый продукт которого является негативным регулятором сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR [95, 169, 174, 192, 202, 203, 205, 208, 209, 217, 269, 374]. Известно, что даже незначительное снижение этого белка может приводить к гиперактивации этого сигнального пути и способствовать развитию многих злокачественных опухолей, в том числе рака легкого [271]. В некоторых случаях AhR способен выполнять роль негативного регулятора, так, пониженный уровень AhR приводит к повышению экспрессии микроРНК-96. Было показано, что хроническое воздействие сигаретного дыма у мышей AhR^{-/-} приводит к резкому увеличению микроРНК-96 [46]. Исследование китайских коллег показывает снижение уровня микроРНК-335 в ответ на опосредованное сигаретным дымом увеличение уровня AhR. Таким образом, изменение уровня экспрессии AhR может менять экспрессию как онкогенных, так и онкосупрессорных микроРНК [47, 95, 169, 174, 192, 202, 203, 205, 208, 209, 217, 269, 374].

Wang и соавторы в своей работе изучали связь активности AhR и экспрессии лиганда рецептора программированной клеточной гибели 1 (PD-L1)

[324]. Это трансмембранный белок с молекулярной массой 40 кДа, экспрессируемый на Т- и В-лимфоцитах, НК-клетках, дендритных клетках, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках. Этот белок способен связываться не только с рецептором PD-1, но и обладает сродством к CD80 (B7.1) – белку, находящемуся на поверхности дендритных клеток, активированных В-клеток и моноцитов, который стимулирует активацию и выживаемость Т-лимфоцитов путем взаимодействия с CD28 на их поверхности. Лиганд PD-L1 способен угнетать этот процесс путем конкурентного связывания с CD80 (Рисунок 14) [193].

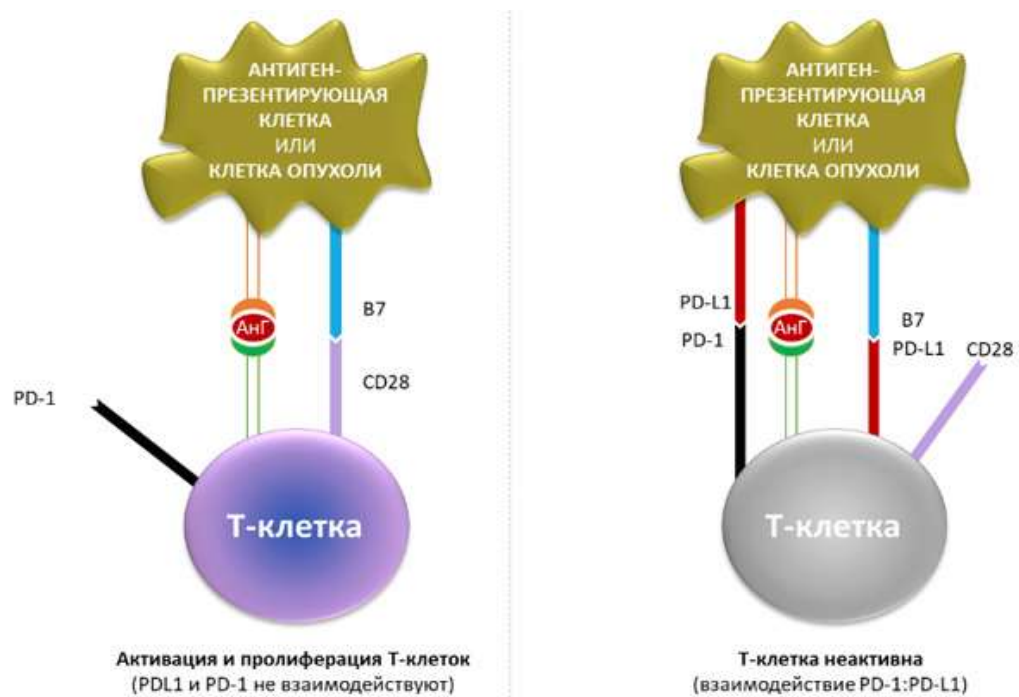


Рисунок 14 – PD-1/PD-L1 сигнальный каскад в межклеточном взаимодействии иммунокомпетентных клеток. При связывании лиганда PD-L1 с рецепторами PD-1 и B7.1, находящимися на Т-лимфоцитах, происходит угнетение цитотоксической активности Т-лимфоцитов

В норме PD-L1 участвует в физиологическом механизме подавления аутоиммунных реакций, но при экспрессии PD-L1 опухолевыми клетками данный лиганд участвует в механизмах ускользания опухоли от иммунного контроля, т. е. при взаимодействии PD-L1 опухолевой клетки или клеток ее окружения с

рецептором PD-1 на Т-лимфоците происходит деактивация Т-лимфоцита и подавление иммунного ответа на чужеродный опухолевый антиген (Рисунок 15) [191, 383].



МНС = главный комплекс гистосовместимости; PD-1 = рецептор программированной гибели 1; PD-L1 = лиганд программируемой клеточной гибели 1; TCR = Т-клеточный рецептор.

Рисунок 15 – Сигнальный путь PD-1/PD-L1, инактивирующий действие Т-лимфоцитов

Одним из механизмов усиления экспрессии PD-L1 на опухолевой клетке является повышенная активация AhR химическими веществами в составе табачного дыма (БП и др.), который может связываться с DRE в промоторе гена, отвечающего за экспрессию PD-L1 [306]. Wang и соавторы подробно описали этот механизм, в их эксперименте был приготовлен экстракт табачного дыма, которым обрабатывались нормальные эпителиальные клетки легких (16HBE) и клеточные линии немелкоклеточного рака легкого (H460). После чего было показано, что в 20–40 % клеток значительно повышалась активность *PD-L1* как на уровне мРНК, так и на уровне белка [130, 324]. В этом эксперименте в основном был использован БП для воздействия на клеточные линии, и повышенная активность *PD-L1* зависела от дозы и времени воздействия бензо(а)пиреном. Была проанализирована последовательность гена *PD-L1* и было выявлено два XRE (xenobiotic responsive element) 5'-GCGTC-3' и 5'-GCGCG-3' в его промоторной зоне, следовательно, БП связываясь с AhR, вызывает его активацию и димеризацию с ARNT в ядре, и далее этот комплекс может связываться с XRE в

промоторе гена *PD-L1*, тем самым повышая его экспрессию, и в конечном счете позволяет опухолевой клетке ускользать от иммунного ответа [324].

Эти данные подтверждаются и клиническими наблюдениями, известно, что пациенты курильщики с РЛ чаще имеют повышенную экспрессию PD-L1 в опухоли, и у этой группы пациентов хуже показатели выживаемости по сравнению с пациентами не курильщиками [26, 262]. В тоже время курильщики лучше отвечают на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, которые представлены, чаще всего, антителами, блокирующими PD-L1 на опухоли или PD-1 рецептор на иммунных клетках [61, 98, 383]. Нужно отметить, что работа Wang и соавторов позволяет рассматривать AhR, как мишень для таргетной терапии рака легкого как в самостоятельном плане, так и в комбинации с известными ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [289, 324].

1.8 Роль микроРНК в канцерогенезе легкого

МикроРНК в своей окончательной форме представляет собой не кодирующую молекулу РНК длиной ~ 20–24 нуклеотида, они привлекли к себе внимание после открытия их выдающейся роли в процессе онкогенеза, регулируя клеточный цикл, метастазирование, ангиогенез, метаболизм и апоптоз посредством посттранскрипционной регуляции мРНК. В разрезе участия микроРНК в патогенезе рака легкого интересен факт регуляции экспрессии рецептора PD-1 и его лиганда PD-L1. Эти молекулы играют важную роль в ускользании опухоли от иммунного ответа, что приводит к созданию микросреды, способствующей росту и прогрессированию опухоли [199].

У животных микроРНК взаимодействует с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК-мишени. Зачастую достаточным условием для связывания с мРНК служит комплементарность между консервативным участком со 2-го по 8-й нуклеотиды на 5'-конце микроРНК (seed region) и 3'-UTR мРНК. Идеальное, или почти идеальное, связывание seed-последовательности с мРНК индуцирует деградацию мРНК, тогда как несовершенное связывание ведет к

ингибированию синтеза белка. Любой способ приводит к снижению уровня белка. МикроРНК способны регулировать гены и другими способами. Например, некоторые микроРНК связываются с последовательностью в 5'UTR гена вместо 3'UTR. Связывание в 5'UTR может привести либо к активации транскрипции гена, либо к ее ингибированию [198, 369].

Рассматривая биогенез микроРНК нужно отметить, что первоначально она транскрибируется как длинная молекула-предшественник (длиной > 1 000 нуклеотидов), называемая первичным транскриптом микроРНК (пре-микроРНК). Этот транскрипт имеет шпилечные структуры, которые обрабатываются ферментом Drosha в ядре, и функционирует как часть микропроцессорного комплекса. Вновь синтезированная, пре-микроРНК транспортируется в цитоплазму посредством exportin-5 и имеет длину 60–100 нуклеотидов. Далее пре-микроРНК обрабатывается ферментом Dicer вместе с белком TRBP/PACT, который трансформирует ее в зрелый дуплекс микроРНК. Фермент Dicer разрезает микроРНК на две части, в результате чего образуются дуплексные цепи микроРНК. Традиционно, только одно из этих плеч микроРНК считалось важным в регуляции генов: плечо, которое предназначено для загрузки в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC) и встречается в клетке с более высокой концентрацией. Эту цепь часто называют «проводником» и обозначают как микроРНК-5p. Другая цепь называется «минорной микроРНК» или «пассажирской микроРНК» и часто обозначается как микроРНК-3p. После обработки дуплексные нити микроРНК соединяются с белком Argonaute 1 и 2 (AGO1 и AGO2) для образования предшественника RISC. Комплекс заставляет дуплекс раскручиваться, и пассажирская цепь отбрасывается, оставляя после себя зрелый RISC, несущий зрелую одноцепочечную микроРНК, которая связывается с 3'UTR мРНК-мишени, что приводит либо к снижению трансляции, либо к деаденилированию [83, 199].

Известно, что развитие рака легкого это многоэтапный процесс, который включает множественные изменения в онкогенах и генах-супрессорах опухоли в течение определенного периода времени, как правило, в течение нескольких лет.

Связанные с развитием рака микроРНК могут выполнять как онкогенные функции, так и выступать в качестве супрессоров злокачественной трансформации (Рисунок 16) [285, 380].

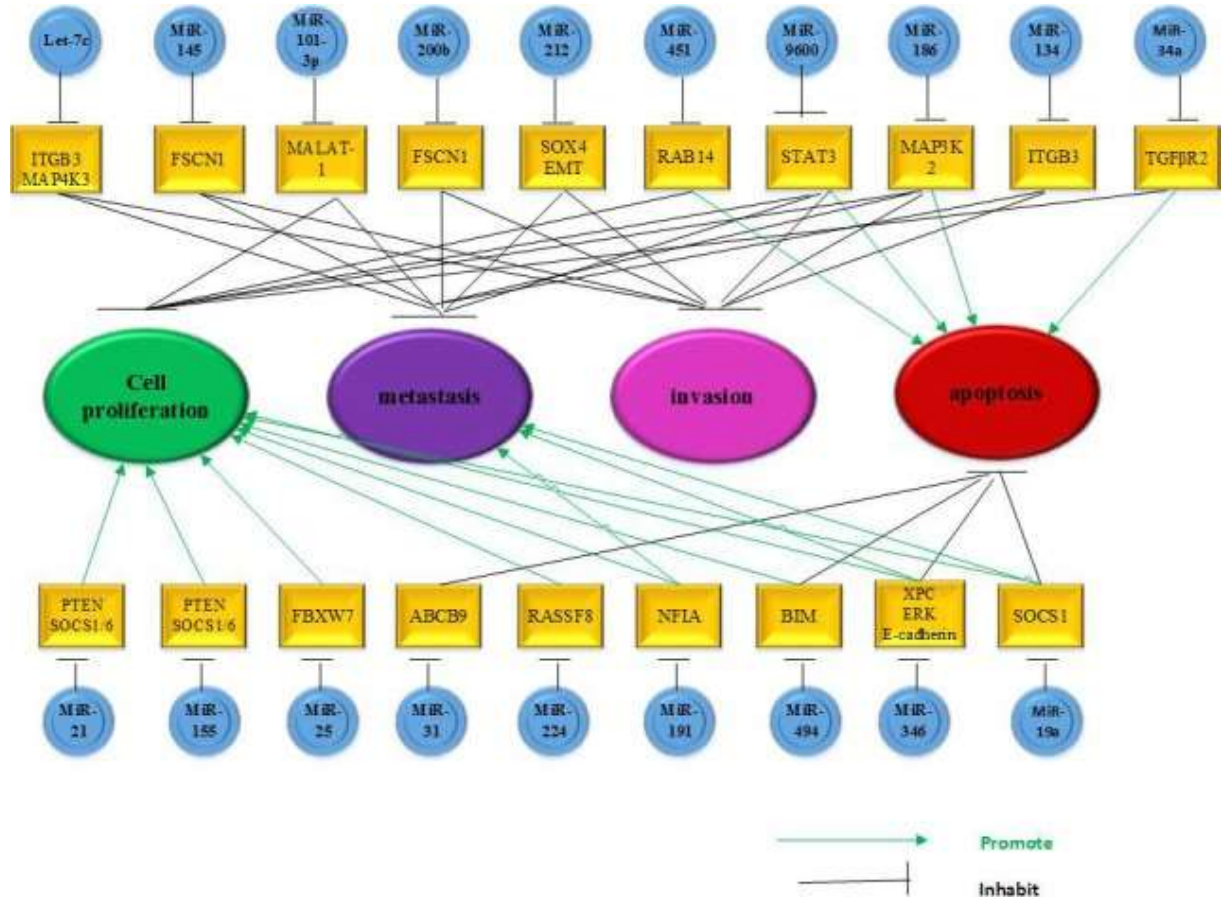


Рисунок 16 – Нарушенная регуляция микроРНК, участвующих в биологических процессах рака легкого

Рассмотрим некоторые ключевые онкосупрессорные микроРНК. Экспрессия микроРНК-34 подавляется в опухолевых тканях рака легкого по сравнению с нормальной неизменной тканью, что приводит к повышенной экспрессии их генов-мишеней (MET, BCL2, PDGFR α , PDGFR β) и повышению пролиферативной активности клеток. Более того, предполагается, что семейство микроРНК-34 может быть ключевым эффектором опухолевого супрессора p53 для ингибирования роста клеток НМРЛ и уклонения от иммунного ответа через регулирование передачи сигнала PD1/PD-L1. В некоторых исследованиях было

определено влияние эффекта метилирования микроРНК-34b/c на прогноз НМРЛ. Эти результаты позволяют предположить, что метилирование семейств микроРНК-34 может служить ингибитором метастазирования опухоли и прогностическими биомаркерами для пациентов с НМРЛ [23, 73, 318].

К другому известному представителю онкосупрессорных микроРНК, играющих важную роль в канцерогенезе рака легкого, относится семейство микроРНК-200, состоящее из пяти членов (микроРНК-200a, -200b, -200c, -141 и -429), которые сгруппированы и экспрессируются в виде двух отдельных полицистронных транскриптов пре-микроРНК, микроРНК-200b, -200a, -429 и микроРНК-200c, -141, расположенных на 1 и 12 хромосомах соответственно. МикроРНК-200 оказывает ключевую функцию в подавлении процесса эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), что является основным механизмом метастазирования и инвазии рака. В условиях снижения активности микроРНК-200 происходит индукция транскрипционных факторов ZEB1 и ZEB2, которые подавляют экспрессию трансмембранного рецептора адгезии E-кадгерина и увеличивают экспрессии мезенхимальных маркеров, включая виментин, коллаген, фибронектин, это приводит, в свою очередь, к приобретению клетками мезенхимальных морфологических признаков, что характеризуется разборкой плотных контактов и потерей апикально-базальной полярности, что способствуют миграции раковых клеток и инвазии [206, 220, 227, 286].

Еще одним представителем онкосупрессорных микроРНК вовлеченных в патогенез развития рака легкого является семейство let-7. Эти микроРНК отрицательно регулирует онкогены, такие как KRAS, c-MYC, CDK6, NOXA9, TGFBR1, BCL-XL и MAP4K3, и тем самым обеспечивают антионкогенный эффект [279]. В эксперименте было показано, что let-7 подавляет инициацию опухоли в модели немелкоклеточного рака легкого у трансгенных мышей K-RasG12D, которая была эффективно восстановлена за счет эктопической экспрессии K-RasG12D, лишенной 3'-UTR, let-7 также ингибировал *in vitro* и *in vivo* рост K-RasG12D-экспрессирующих клеток рака легкого мыши и ксенотрансплантатов рака легкого человека [244, 354].

В некоторых исследованиях показано, что ген *HMGA2*, который кодирует негистоновый хромосомный белок высокой подвижности с предполагаемой онкогенной функцией, находится под контролем *let-7*. При некоторых типах злокачественных новообразований локус гена *HMGA2* в результате хромосомной транслокацией теряет 3'-UTR, которая содержит несколько сайтов связывания с *let-7*, что приводит к повышению экспрессии этого гена и повышению его онкогенной активности [199].

Мишенями *let-7* также являются различные гены, связанные с клеточным циклом, такие как циклин D2, CDK6 и CDC25A и различные онкофетальные гены, включая протеин 1, связывающий мРНК инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP1, также называемый IMP-1/CRD-BP) и IGF2BP2/IMP-2, которые могут усиливать пролиферацию и злокачественную трансформацию. Интересно, что снижение экспрессии *let-7* связано с худшей выживаемостью, неблагоприятным послеоперационным прогнозом, и, что самое интересное, подавление экспрессии *let-7* отмечалось чаще всего у никогда не куривших пациентов с РЛ [199, 200, 279].

Наиболее высокоэкспрессированными и значимыми онкогенными микроРНК при раке легкого является микроРНК-21 и микроРНК-155, которые связывают свои гены мишени, тем самым являются ключевыми в канцерогенезе рака легкого [149, 213].

На сегодняшний день существует множество работ, показывающих ценность микроРНК-21 в качестве прогностического и диагностического маркера НМРЛ. Первые публикации, характеризующие эту микроРНК при различных вариантах рака, появились еще в 2004 году, а в 2008 году впервые проявлен интерес к этой микроРНК в контексте прогноза при НМРЛ [256, 336]. Свои онкогенные свойства микроРНК-21 реализует через изменение экспрессии генов-мишеней *SOCS1*, *SOCS6*, *PTEN*, а также может активировать сигнальные пути по средствам воздействия на STAT3, EGFR, TGF- β и более того менять активность гена *p53*, являющегося ключевым геном в развитии различных видов рака. Недостаточная активность PTEN из-за сверхэкспрессии микроРНК-21 приводит к

повышению активности PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, что реализует бесконтрольный рост и пролиферацию клеток рака легкого [203, 215]. Посредством изменения SMAD7-TGF- β сигнального пути микроРНК-21 может участвовать в эпителиально-мезенхимальном переходе (EMT) усиливая миграцию и инвазию клеток рака легкого, что может запускать процесс метастазирования [256].

Описанные выше молекулярные изменения, связанные с активностью микроРНК-21 имеют и конкретные клинические точки приложения. Повышенная экспрессия микроРНК-21 связана со снижением выживаемости больных с НМРЛ и является предиктором резистентности к проводимому противоопухолевому лечению, в частности, сверхэкспрессия микроРНК-21 ассоциируется с приобретенной резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы при EGFR-позитивном НМРЛ [283]. Активация пути PI3K/Akt/mTOR может быть причиной резистентности РЛ к лучевой терапии и химиотерапии, а снижение уровня микроРНК-21 в плазме на фоне проводимого лечения может быть маркером эффективности лечения [319, 328, 338]. Существуют и гендерные различия эффектов микроРНК-21, так, например, сверхэкспрессия микроРНК-21, в значительно большей степени ухудшает выживаемость у женщин [256]. Le и соавторы исследовали уровень микроРНК-21 в плазме крови у 82 пациентов с НМРЛ до операции и через 10 дней после операции, и показали, что уровень этой микроРНК значительно выше до операции и снижается после операции [114]. Более того высокие показатели микроРНК-21 в плазме до операции коррелировали с более короткой общей выживаемости и более высоким риском раннего рецидива рака у этих больных [114, 115].

С другой стороны, микроРНК-21 может быть использован как маркер ранней диагностики РЛ посредством жидкостной биопсии (определение уровня микроРНК в плазме или мокроте). В исследованиях такого рода сверхэкспрессия микроРНК-21 в мокроте может быть маркером злокачественной трансформации [238, 295, 368].

Как уже упоминалось, микроРНК-155 является еще одной высокоэкспрессированной микроРНК при НМРЛ с онкогенными функциями [213,

335]. Эта микроРНК продуцируется в результате процессинга кластера интеграции В-клеток (ВІС), который представляет собой некодирующий транскрипт, экспрессируемый в активированных В-клетках, Т-клетках, моноцитах и макрофагах [148, 190]. Ген ВІС активируется вставкой промотора в сайт ретровирусной интеграции на хромосоме 21q21 при В-клеточных лимфомах, индуцированных вирусом птичьего лейкоза [148, 190]. Онкогенные функции микроРНК-155 поддерживаются посредством активации пролиферативных сигналов, уклонения от ингибирования роста клеток и апоптоза, индукции ангиогенеза, активации инвазии и метастазирования [148, 214]. Список мишеней микроРНК-155 достаточно большой и может насчитывать более 140 генов. Например, список некоторых из них, которые могут быть вовлечены в злокачественную опухолевую трансформацию: *APC*, *KRAS*, *Rb1*, *TS1*, *MYB*, *RHOA*, *SKI*, *SOCS1*, *SP11*, *FOXO3*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*. В частности, наиболее изученным механизмом онкогенеза, осуществляемым микроРНК-155, является связывание их с 3'-нетранслируемыми областями (3'-UTR) генов-мишеней *SOCS1*, *SOCS6* и *PTEN*. Супрессор цитокиновой сигнализации 1 (*SOCS1*) может значительно индуцировать апоптоз и подавлять рост клеток рака легкого [148, 206]. Супрессор цитокиновой сигнализации 6 (*SOCS6*) широко экспрессируется во многих тканях и подавляется при многих видах рака, включая РЛ [148, 199]. Снижение числа копий и уровней мРНК *SOCS6* связано с рецидивом заболевания при первичном раке легкого и, таким образом, может служить полезным прогностическим маркером [148, 286]. Кроме того, в исследованиях показано, что гомолог фосфатазы и тензина (PTEN) действует как супрессор опухоли при РЛ, снижение активности PTEN приводит к активации PI3K/Akt/mTOR сигнального пути, что значительно повышает способность опухоли к метастазированию и инвазии [202, 328]. Такая связь микроРНК-155 и *SOCS1*, *SOCS6* и *PTEN* была хорошо продемонстрирована в исследовании Хуе и соавторов, они изучили экспрессию микроРНК-155 и его генов-мишеней у больных НМРЛ разных стадий, и показали, что по мере прогрессирования РЛ повышалась экспрессия микроРНК-155, тогда как экспрессия генов *SOCS1*, *SOCS6* и *PTEN* постепенно снижалась [213]. В других

исследованиях была выявлена связь между микроРНК-155 и TP53, еще одним ключевым супрессором опухолевой трансформации. Корреляция этих двух маркеров представлена по механизму отрицательной обратной связи. Наличие комбинации повышенной экспрессии микроРНК-155 и сниженной экспрессии TP53 достоверно ассоциирована с низкими показателями выживаемости больных НМРЛ [113, 213].

В некоторых исследованиях показано, что TSF4 – важный регулятор эпителиально-мезенхимального перехода – является прямой мишенью микроРНК-155. К тому же эти эксперименты дополнительно свидетельствуют о двойной роли данной микроРНК, определяемой типом, локализацией и стадией развития опухоли, поскольку существуют свидетельства и о промотирующем ЕМТ-действии микроРНК-155, полученные как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях [43, 341].

В составе опухолевых экзосом, которые играют важную роль в развитии отдаленных метастазов, в частности в создании премеагастатических ниш, часто обнаруживают микроРНК-155 [92]. Этот факт еще раз подтверждает участие микроРНК-155 в опухолевой прогрессии и метастазировании. Примечательно, что при рецидивах рака легкого содержание микроРНК-155 и микроРНК-21 в экзосомах, полученных из плазмы, выше, чем у больных с первичными опухолями [92, 202, 229].

Заслуживает внимания тот факт, что, в отличие от онкогенной микроРНК-21, являющейся маркером низких показателей как общей, так и безрецидивной выживаемости больных НМРЛ, при повышенном уровне экспрессии микроРНК-155 в клетках опухолей РЛ (преимущественно аденокарцином) показатели общей выживаемости значимо не меняются, однако появление рецидивов и метастазов наблюдается в более ранние послеоперационные сроки. Таким образом, очевидно, что микроРНК-155 может выступать как маркер неблагоприятного прогноза у радикально оперированных больных [43, 229].

Особое место в регуляции канцерогенеза отводится микроРНК посредством влияния на иммунную систему и, в частности, регуляции механизмов ускользания

опухолевой клетки от иммунного надзора. Изменение профиля экспрессии микроРНК в опухоли может повлиять на функции натуральных киллеров (NK), макрофагов и дендритных клеток, которые являются ключевыми игроками врожденного иммунитета.

Одним из основных типов NK, участвующих в опухолевом надзоре, являются NKG2D, активация которых осуществляется их лигандом NKG2DL. В свою очередь NKG2DL содержит гликопротеины MICA и MICB (major histocompatibility complex class I chain-related protein A or B), они родственные МНС класса I. Опухолевые клетки могут содержать MICA и MICB, что способствует активации NK и гибели опухолевых клеток, однако за счет изменения активности некоторых микроРНК опухоль может ускользать от надзора NK. Например, микроРНК-21a имеет сайты связывания с 3'UTR MICA/B и может подавлять сигналинг на NK. Более того микроРНК могут способствовать сбросу MICA/B с поверхности опухолевых клеток в кровь, что замедляет активность NK [288, 337].

Другим представителем иммунной системы, вовлеченным в опухолевый контроль, является макрофаг. Основной функцией макрофагов является фагоцитоз, однако существует два фенотипа этих клеток. Классические макрофаги M1 подавляют опухолевую клетку и макрофаги с альтернативной активностью M2, которые могут способствовать развитию опухоли. Поляризация макрофагов в сторону M1 осуществляется ядерным фактором Каппа В (NF-κB). Повышение экспрессии микроРНК-21 и микроРНК-146a в опухоли может влиять на регуляторную роль миелоидного фактора дифференцировки 88 (MyD88) в пути toll-подобного рецептора 4 (TLR4), что в свою очередь приводит к ингибированию NF-κB и формированию иммуносупрессивного опухолевого окружения с преобладанием макрофагов M2 [288, 337]. По мимо NF-κB на поляризацию макрофагов могут влиять транскрипционные факторы STATs и PPARs, а повышенная экспрессия микроРНК-21 может усиливать активность STATs с поляризацией макрофагов в сторону M2. Снижение экспрессии

онкосупрессорной микроРНК-130а приводит к повышенной активности PPARs и увеличению M2 макрофагов [210, 214].

Дендритные клетки (ДК), являются ключевыми клетками презентации чужеродного антигена на наивные Т-клетки. В исследованиях выяснилось, что микроРНК-155 четко связана с созреванием ДК в злокачественных опухолях легкого и молочной железы, а повышенная экспрессия этой микроРНК приводит к формированию иммуносупрессивного опухолевого окружения [60, 206].

Кроме изменения активности антиген-презентирующих клеток микроРНК могут регулировать и собственно Т-клетки. Так показана роль микроРНК-20а в ингибирование активации транскрипции в линиях Т-клеток. Активация Т-клеточных рецепторов (TCR) приводит к быстрой индукции повышения экспрессии микроРНК-20а, что выражается в негативной регуляции сигнала TRC посредством ингибирования фосфорилирования ZAP70, LAT, PLC-g и Erk, а также экспрессии CD96. Более того микроРНК-20а осуществляет влияние на клеточный иммунитет за счет ингибирования экспрессии цитокинов ИЛ-10, ИЛ-2 и ИЛ-4 [337].

В последнее время нарастает интерес к микроРНК как мишени для таргентной терапии рака. Потенциальные терапевтические эффекты могут реализовываться несколькими основными путями. Довольно часто в исследованиях используются наночастицы с прямым блокирующим действием на микроРНК или наночастицы, несущие на себе дополнительно различные цитостатики. Кроме этого, возможен и другой сценарий реализации лечебного эффекта, путем блокирования или активации генов-мишеней микроРНК. Однако надо отметить, что часто такие комплексы, блокирующие микроРНК или системы их доставки не стабильны, что в значительной мере затрудняет внедрение таких методов лечения в клиническую практику [64, 201, 231, 219, 319, 256].

1.9 Фосфоинозитол 3-киназный путь (PI3K) в канцерогенезе легкого

Фосфоинозитол 3-киназный путь (PI3K) является одним из важнейших сигнальных каскадов, регулирующих клеточный рост, выживание и метаболизм [79, 123, 189, 192]. Он был открыт более 20 лет назад, когда было показано усиление активности липидной киназы PI3K. Последующие исследования доказали усиление ее активности во многих раковых клетках [79].

Существует 3 класса киназ PI3K, различающихся по структуре и функциям. Наибольший интерес в канцерогенезе представляет класс IA PI3K, так как он чаще всего ассоциирован с возникновением рака. Различают 3 гена этого класса: *PIK3R1*, *PIK3R2* и *PIK3R3*, – активирующие мутации, которые находят в опухолевых клетках человека. Киназный каскад IA PI3K запускается, главным образом, факторами роста, которые активируют рецепторы тирозин-киназ (Рисунок 17) [79, 364].

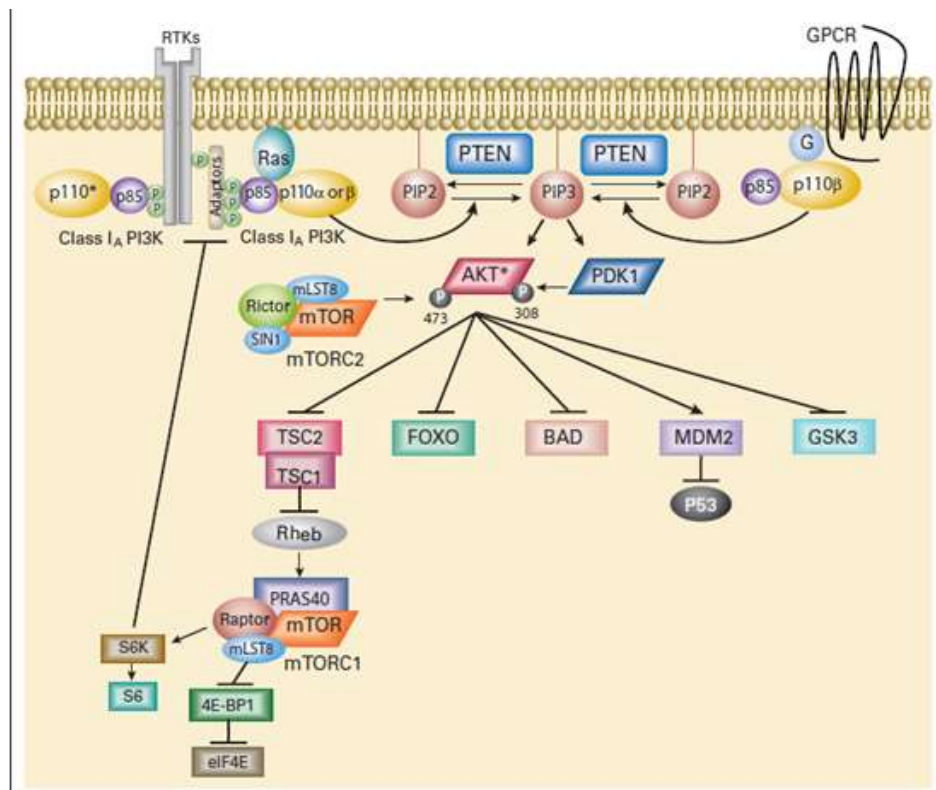


Рисунок 17 – Фосфоинозитол 3-киназный каскад [79]

Киназа IA PI3K состоит из регуляторной и каталитической субъединиц. Регуляторная субъединица p85 напрямую присоединяется к фосфотирозиновому остатку рецептора и/или адапторам. Это событие приводит к высвобождению каталитической субъединицы p110 и перемещениям киназы к мембране, где находится ее субстрат фосфоинозитол 4,5-бифосфат (PIP2) [79]. Киназа PI3K может также стимулироваться активированным белком Ras или рецепторами G-белков. В результате взаимодействия p110 и PIP2 образуется фосфоинозитол 3,4,5-трифосфат (PIP3), являющийся гидроксильным по 3-й позиции PIP2 [79, 192]. Онкосупрессор PTEN (гомолог фосфатазы и тензина, удаленный на десятой хромосоме) дефосфорилирует PIP3 до PIP2, прерывая, таким образом, PI3K-сигнальный путь, что приводит к остановке клеточного цикла G1 и апоптозу. Метаболит PIP3 проводит сигналы, напрямую связываясь с доменами PH (pleckstrin homology), которые есть у различных сигнальных белков. В итоге, PIP3 взаимодействует посредством PH-домен-содержащих киназ: PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) и АКТ. Результатом такого взаимодействия является фосфорилирование АКТ по треонину 308 киназой PDK1. Путь PI3K–АКТ усиливает рост клетки и выживание по нескольким механизмам. АКТ способствует выживанию клетки, ингибируя проапоптотические белки семейства Bcl-2, BAD и BAX. Кроме этого, АКТ также негативно регулирует транскрипционный фактор NFkB, что приводит к усилению транскрипции антиапоптотических генов и генов выживания. Фосфорилирование MDM2 киназой АКТ ингибирует p53-опосредованный апоптоз. Киназа АКТ также фосфорилирует белок TSC2, ингибируя тем самым ГТФ-азную активность димера TSC1/TSC2. Активированный Rheb стимулирует мишень рапамицина (mTOR) у млекопитающих, содержащую белковый комплекс mTORC1, что приводит к повышению активности киназы p70 S6 [79, 158, 192].

Ингибирование сигнального пути PI3K снижает скорость клеточной пролиферации и в некоторых случаях вызывает клеточную смерть. Поэтому компоненты этого пути являются перспективными мишенями для таргетной терапии рака и других заболеваний человека. Большое число ингибиторов этого

сигнального пути проходит в настоящее время преклинические и ранние клинические испытания [79, 192, 273].

В этой связи как компонент PI3K-сигнального пути большой интерес вызывает опухолевый супрессор PTEN. Он впервые был идентифицирован в 1997 году двумя независимыми исследовательскими группами при изучении хромосомной локализации 10q23 [151, 192].

Вскоре после этого мутации PTEN были также обнаружены в зародышевой линии пациентов с группой аутосомно-доминантных синдромов, называемых в совокупности синдромами опухоли гамартомы PTEN (PHTS), которые характеризуются наличием множественных гамартом, повышенной предрасположенностью к раку и неврологическими симптомами [371].

PTEN человека представляет собой белок из 403 аминокислот, который содержит четыре функциональных домена: N-концевой PI(4,5)P2-связывающий/фосфатазный домен, домен каталитической фосфатазы, липидный или мембраносвязывающий домен C2, карбоксиконцевой хвостовой домен (С-хвост) и PDZ-связывающий домен (PDZ-BD).

Известно несколько механизмов изменения активности PTEN, которые могут приводить к развитию различных типов рака. Рассматривая генетические повреждения, нужно отметить, что ген *PTEN* демонстрирует точечные мутации в нескольких типах опухолей, преимущественно при глиобластоме, раке эндометрия и предстательной железы и в меньшей степени при раке молочной железы, легкого и толстой кишки [192, 371]. Исследования показали, что соматические инактивирующие мутации *PTEN*, как правило, происходят в областях, кодирующих либо фосфатазный, либо C2-домен (экзоны 1-8) и неизменно приводят к полной потере каталитической активности, поскольку оба домена необходимы для формирования активной каталитической единицы. Результатом таких мутаций является отмена или снижение дефосфорилирования PIP3 и активация PI3K-сигнального пути. Частота мутаций в области, которая кодирует С-концевой хвост белка PTEN (экзон 9), ниже, чем в других областях, необходимых для его каталитической активности, и эти С-концевые мутации,

скорее всего, влияют только на стабильность белка и его посттрансляционной регуляции вместо полной потери функции (Рисунок 18) [19, 167].

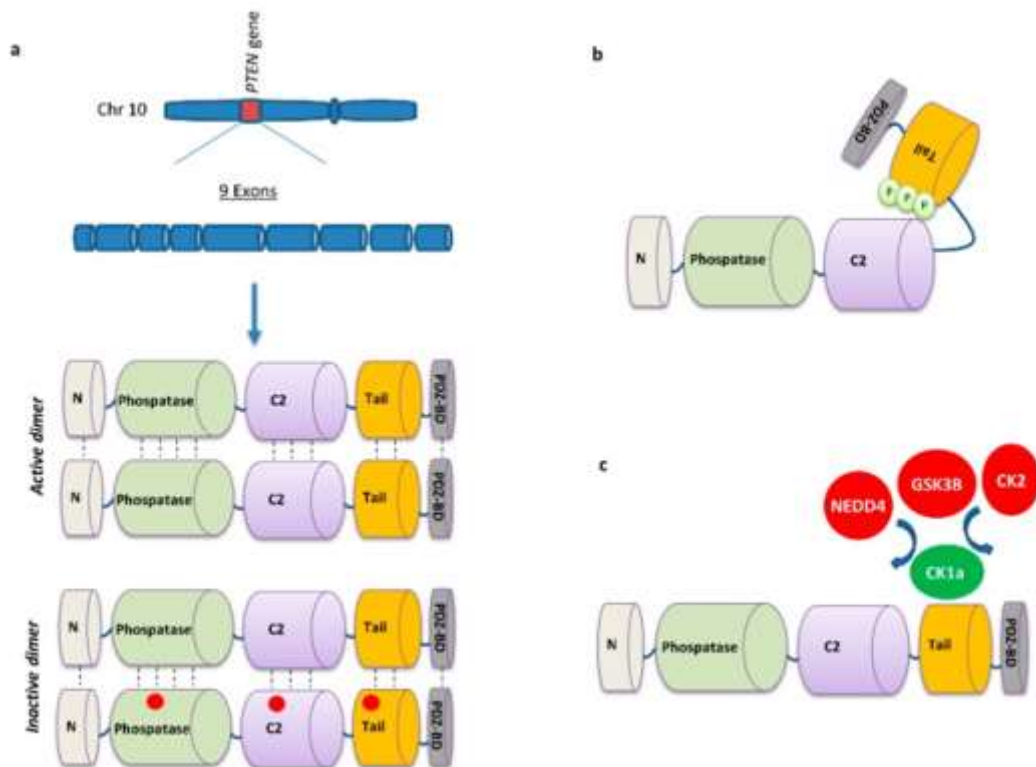


Рисунок 18 – Механизмы изменения экспрессии и функции PTEN:

а – PTEN расположен на хромосоме 10q23.3 человека и содержит девять экзонов, кодирующих многодоменный белок. Активность PTEN может быть усилена его гомодимеризацией, тогда как мутированные пептиды PTEN делают гомодимер неактивным; б – фосфорилирование С-концевого хвоста PTEN индуцирует взаимодействие с доменом C2, способствуя сворачиванию хвоста, устанавливая закрытую и неактивную конформацию; с – PTEN является мишенью фосфорилирования и убиквитинирования для различных факторов, которые приводят к инактивации/деградации (CK2/NEDD4), в то время как другие факторы выполняют защитную роль (CK1 α) (CK2 – казеинкиназа 2; GSK3B – киназа гликогенсинтазы 3 бета; NEDD4 – белок 4, экспрессируемый нервными клетками-предшественниками, подавленный в процессе развития; CK1 α – казеинкиназа 1 альфа)

Интересно, что для рака легкого нехарактерен такой вариант нарушений, так как число мутаций в гене *PTEN* для плоскоклеточного рака легкого составляет менее 2 %. Низкий процент мутаций в гене *PTEN* от общего количества нарушений может свидетельствовать о том, что в клетке может происходить его транскрипционное или посттранскрипционное нарушение регуляции [192, 269, 272].

Эпигенетическая и транскрипционная регуляция *PTEN* может осуществляться как по пути его активации, так и подавления. Опухолевый белок p53, PPAR γ (пероксисом пролиферативно-активируемый рецептор γ) и EGR1 (белок 1 ответа на ранний рост) связываются с промотором *PTEN* напрямую и позитивно регулируют его экспрессию [281, 330]. Исследования последних лет указывают на взаимодействие между PTEN и p53, в котором они регулируют друг друга как на транскрипционном, так и на белковом уровне. Было показано, что белок p53 связывается с промотором *PTEN*, таким образом активируя его экспрессию, в то время как белок PTEN косвенно увеличивает экспрессию p53 посредством регуляции транскрипции MDM2, которая является его ключевым регулятором [192, 340]. Другие факторы транскрипции, такие как BMI1, c-Jun и ядерный фактор каппа В (NF κ B) связываются с промотором *PTEN* и негативно регулируют транскрипцию его гена в различных биологических условиях и в частности могут отвечать за эпителиально-мезенхимальный переход и метастазирование [334]. Интересно, что NOTCH1 негативно регулирует экспрессию PTEN путем активации ингибитора hairy и энхансера split1 (HES1) [192]. В опухолях, где потеря или мутация обеих копий гена PTEN встречается редко, часто можно встретить aberrантное гиперметилирование CpG-островков на промоторе *PTEN*, что приводит к снижению его функции [186]. Более того, транскрипция *PTEN* может модулироваться ацетилированием гистонов. Сообщалось, что фактор транскрипции SAL-подобный белок 4 (SALL4) связывается с промотором *PTEN* и подавляет его транскрипцию за счет рекрутирования сильного эпигенетического репрессора, комплекса ремоделирования нуклеосом и деацетилазы (NuRD), который содержит АТФазу, ремоделирующую хроматин, а также проявляет активность гистондеацетилазы [312].

Посттранскрипционная регуляция *PTEN* в основном обусловлена взаимодействием различных микроРНК с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК *PTEN*, что приводит к ее деградации. Наиболее изученными микроРНК, мишенью которых является *PTEN*, являются микроРНК-21, -155, -181a, -93, -301a, -26b, -4286 [95, 169, 174, 204, 213, 215]. С другой стороны, микроРНК могут оказывать косвенное влияние на экспрессию *PTEN* посредством изменения экспрессии рассмотренных выше факторов транскрипции. В современных исследованиях все чаще рассматривается возможность моделирования функции микроРНК для увеличения экспрессии *PTEN* как многообещающий терапевтический инструмент в онкологии [192, 203, 375].

Посттрансляционная модификация *PTEN* осуществляется за счет фосфорилирования, убиквитинирования, окисления и ацетилирования. Фосфорилирование является ключевым регуляторным механизмом, контролирующим фосфотазную активность *PTEN*, его стабильность и субклеточную локализацию. *PTEN* фосфорилируется по кластеру остатков серина и треонина (Ser380, Thr382, Thr383 и Ser385), расположенному на его С-концевом хвосте с помощью киназы СК2 [271, 348]. Это способствует поддержанию закрытой, но более стабильной конформации, в которой С-хвост связывается с доменами С2 и фосфатазы. В результате этого конформационного изменения закрытый *PTEN* показывает уменьшенную локализацию в плазматической мембране и сниженную активность липидфосфатазы по сравнению с открытым конформационным состоянием [121, 192, 271]. Некоторые исследования показали, что фосфорилирование С-хвоста снижает способность *PTEN* связываться с белками, содержащими PDZ-домен, включая инвертированный белок 2, ассоциированный с мембраной гуанилаткиназы (MAGI-2). Он действует как каркасный белок, который облегчает сборку *PTEN* в многобелковый сигнальный комплекс, повышая стабильность *PTEN* и, следовательно, увеличивая его способность подавлять активацию Akt (см. рисунок 18) [192, 271].

Убиквитинирование *PTEN* убиквитин-(Ub)лигазами E3 влияет на его каталитическую активность, а также на его стабильность и субклеточную

локализацию. Было показано, что добавление нескольких цепей убиквитина может привести к протеасомозависимой деградации PTEN, тогда как добавление одной единицы убиквитина может увеличить стабильность PTEN и способствовать его ядерной локализации [356]. Наиболее изученной убиквитиновой лигазой PTEN является NEDD4-1. Показано, что NEDD4-1 связывается с PTEN, катализирует его полиубиквитинирование и вызывает деградацию PTEN [323]. Более того, уровни NEDD4-1 обратно коррелировали с уровнями PTEN в различных опухолях. В недавних исследованиях было обнаружено, что адапторный белок Numb является партнером по связыванию NEDD4-1 и играет активную роль в модуляции убиквитинирования PTEN (см. рисунок 18) [147].

Известно, что PTEN может подвергаться окислению, и его каталитическая активность может регулироваться активными формами кислорода. Обратимое окисление сайта Cys124 с помощью активных форм кислорода может способствовать образованию дисульфидной связи с Cys71, что, в свою очередь, подавляет активность фосфатазы PTEN [192]. Более того, было показано, что эндогенные активные формы кислорода, генерируемые в стимулированных клетках, способствуют временному окислению и, следовательно, инактивации части белкового пула PTEN, и это коррелирует с активацией нижестоящей передачи сигналов Akt [192]. Обратимое окисление PTEN, вероятно, регулируется тиоредоксин-взаимодействующим белком (Txnip), который действует как негативный регулятор тиоредоксин-НАДФН-зависимого восстановления дисульфидных связей в белках. Исследования на модели мышей с полным нокаутом Txnip показали накопление окисленного PTEN и усиление передачи сигналов Akt [353].

Активность липидфосфатазы PTEN подвергается модуляции посредством ацетилирования. Гистоновая ацетилтрансфераза PCAF (p300/CBP-ассоциированный фактор) ацетирует PTEN по Lys125 и Lys128, оба расположены внутри каталитического кармана. Ацетилирование этих остатков ингибирует активность липидфосфатазы PTEN и, следовательно, снижает подавляющую функцию PTEN

на сигнальный путь Akt [260]. Интересно отметить, что ацетилирование PTEN с помощью PCAF по-видимому происходит только в присутствии факторов роста, что указывает на то, что PCAF может быть регулятором PTEN в ответ на митогенную стимуляцию [192].

Рассматривая роль PTEN в узком контексте канцерогенеза легкого, нужно отметить, что в 30–50 % случаев при НМРЛ отмечается его потеря [272]. Экспрессию PTEN обычно определяют с помощью иммуногистохимии, а низкий уровень белка связывают со снижением выживаемости при раке легкого [271]. Потеря PTEN встречается реже при АКЛ, чем при ПКРЛ, и в большей степени ассоциирована с постоянным курением, так как курение может вызывать снижение экспрессии PTEN (вероятно из-за иммунно-опосредованного механизма) и, соответственно, усиливать активацию передачи сигналов mTOR/Akt в эпителии дыхательных путей у здоровых курильщиков с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) по сравнению с некурящими [139, 255]. Более того, мутации PTEN и потери его активности связаны с устойчивостью к таргетному лечению и иммунотерапии [271]. Интересно, что генетические нарушения PTEN в виде мутаций встречаются довольно редко, не более 2–7 %, и в основном при ПКРЛ [224, 272, 236]. Наиболее широко изученным механизмом посттранскрипционных модификаций PTEN при РЛ является регуляция через микроРНК. Онкогенная микроРНК-21 участвует в канцерогенезе многих видов рака. При раке легкого микроРНК-21 может напрямую связываться с PTEN, а ее нокдаун снижает миграцию и инвазию клеток НМРЛ. Другие исследования на опухолевых ксенотрансплантатах мышей, резистентных к гефтинибу, показали восстановление чувствительности к лечению с помощью анти-микроРНК-21 терапии. МикроРНК-93 также нацелена на PTEN при НМРЛ, ее нокдаун приводил к подавлению миграции и пролиферации клеток рака легкого, а сверхэкспрессия ассоциирована с метастазированием в лимфатические узлы у мышей. МикроРНК-19 вовлечена в ЕМТ *in vitro*, что доказывает ее участие в метастазировании рака. Большинство исследований в научной литературе указывают на негативную регуляцию PTEN через микроРНК,

однако недавние исследования показали, что микроРНК-130 может стабилизировать PTEN и коррелирует с более высоким уровнем его белка, что отразилось на увеличении выживаемости пациентов с РЛ при сверхэкспрессии этой микроРНК. Роль различных микроРНК, нацеленных на PTEN, представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Роль различных микроРНК, нацеленных на PTEN, в прогнозе немелкоклеточного рака легкого и резистентности к терапии

| микроРНК | Экспрессия | Вид материала | Клиническая значимость |
|---|------------|--|--------------------------------------|
| микроРНК-21 | высокая | ткань/ <i>in vitro</i> | химио-радио-резистентность |
| микроРНК-29b | низкая | ткань/ <i>in vitro</i> | метастазирование в л/узлы |
| микроРНК-92a | высокая | ткань | стадия, метастазирование в л/узлы |
| микроРНК-93 | высокая | ткань | плохая выживаемость |
| микроРНК-130b | высокая | <i>in vitro/in vivo</i> | резистентность к цисплатину |
| микроРНК-183 | высокая | ткань/ <i>in vitro</i> | размер опухоли |
| микроРНК-205 | высокая | ткань/ <i>in vitro</i> | химио-резистентность |
| микроРНК-328 | высокая | ткань / <i>in vitro</i> | химио-резистентность |
| микроРНК-374b | высокая | ткань/ <i>in vitro</i> | нет данных |
| микроРНК-449a | низкая | EGFR TKI резистентные NSCLC ткань/ <i>in vitro/in vivo</i> | EGFR TKI-резистентность |
| микроРНК-494 | высокая | ткань | метастазирование в л/узлы, плохая ОБ |
| микроРНК-4286 | высокая | ткань/ <i>in vitro</i> | связь с гистологическим типом |
| Примечание: ОБ – общая выживаемость; NSCLC – немелкоклеточный рак легкого; TKI – ингибиторы тирозинкиназы | | | |

В отличие от низкой частоты генетических нарушений распространенность потери белка PTEN намного выше при НМРЛ. Большинство соответствующих исследований описывают потерю белка PTEN более чем в 40 % случаев НМРЛ, в то время как некоторые из них предполагают корреляцию со статусом курения,

плоскоклеточным гистологическим вариантом рака легкого и снижением выживаемости [41, 176, 327]. Так, Chang и соавторы определяли PTEN иммуногистохимическим методом в опухолях у 289 пациентов с НМРЛ в сравнении с 76 пациентами с доброкачественными опухолями легкого и показали, что 59,86 % (173 / 289) и 3,94 % (3 / 76) соответственно были PTEN-отрицательными. PTEN-отрицательные пациенты с НМРЛ чаще имели метастазы в лимфатические узлы, обычно были курильщиками и имели наихудшую выживаемость [327].

В другом исследовании, где включено 288 пациентов с НМРЛ, которым выполнена радикальная резекция легкого, сообщалось о потере PTEN в опухоли в 42,4 % (122 / 288), что значительно коррелировало с ПКРЛ, статусом курения, запущенной стадией заболевания и большим размером опухоли, а также с более короткой выживаемостью без прогрессирования (ВБП), по сравнению с PTEN-положительными опухолями [177].

Исследование с включением 1 000 пациентов с преимущественно ранними стадиями НМРЛ, проведенное в независимых лабораториях, подтвердило, что гиперэкспрессия цитоплазматического P13K β и низкая или отрицательная экспрессия PTEN были значительно более распространены при ПКРЛ, чем при АКЛ. Более того, было обнаружено, что ПКРЛ чаще коррелирует с одновременной сверхэкспрессией P13K β и обратной экспрессией PTEN, чем АКЛ. Это открытие предполагает потенциальную пользу от использования селективного ингибитора изоформы P13K, особенно для ПКРЛ, у которого в настоящее время не существует таргетных терапевтических агентов [152].

Наконец, Xiao и соавторы в 2016 году провели метаанализ с включением 23 исследований с участием около 2 500 пациентов с НМРЛ и пришли к выводу, что снижение экспрессии PTEN, обнаруженное с помощью ИГХ, было связано с более короткой общей и безрецидивной выживаемостью [270].

Интересно отметить, что исследования, связанные с поиском механизмов резистентности к ИТК при EGFR-мутированном НМРЛ выявили помимо хорошо известных механизмов резистентности, например, мутации T790M, связь с

потерей PTEN и активацией передачи сигналов PI3K/mTOR [382]. Кроме этого важно отметить, что экспрессия PTEN может отражать эффективность использования иммунотерапии в лечении НМРЛ, что повышает ценность этого маркера у этой категории пациентов [271].

Учитывая решающую роль передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR в инициации, прогрессировании и метастазировании рака, некоторые ингибиторы этого пути были протестированы и в последствии включены в терапевтическую стратегию при различных типах рака [271]. Например, темсиролимус и эверолимус ингибиторы mTOR применяются для лечения распространенного почечно-клеточного рака, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы. Ингибитор PI3K алпелисиб одобрен для лечения гормон-рецептор-позитивного, HER2-негативного, PIK3CA-мутированного рака молочной железы [271]. Однако при раке легкого несколько ингибиторов PI3K/Akt/mTOR были оценены в клинических исследованиях в качестве монотерапии и/или комбинированной терапии, демонстрировали широкий спектр побочных эффектов без значимой клинической пользы [264, 265]. С учетом этого возрастает актуальность использования PTEN, как мишени для терапевтического воздействия. Известно, что генетические нарушения PTEN встречаются редко, при этом отмечается около 40 % случаев потери белка, что повышает научный и клинический интерес к использованию в терапевтических целях воздействия на негеномные механизмы регуляции экспрессию PTEN. Более того определение белка PTEN в опухолевых образцах НМРЛ осуществляется достаточно простым и не дорогим методом ИГХ, что значительно повышает значимость этого метода для оценки прогноза на терапию ИТК, иммунотерапию и возможности дополнительного типирования рака легкого [271].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика экспериментального материала

Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: трис(гидроксиметил)аминометан – трис (Медиген, Россия); трис-ацетатный электродный (ТАЕ) буфер (50X) (Thermo Fisher Scientific, США); этилендиаминтетрауксусная кислота – ЭДТА (Медиген, Россия); хлорид калия – KCl (Helicon, Россия); додецилсульфат натрия – SDS (Serva, Германия); глицерол (Helicon, Россия); изопропиловый спирт (Helicon, Россия); ацетон (Helicon, Россия); β-меркаптоэтанол (Helicon, Россия); глицин (Helicon, Россия); набор для проведения обратной транскрипции по матрице РНК и микроРНК – ОТ-М-MuLV-RH (БиоЛабМикс, Россия); набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами для микроРНК – БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) (БиоЛабМикс, Россия); ДНКаза I 2 500 ед/мл (Thermo Fisher Scientific, США); раствор для стабилизации и хранения РНК RNA Later™ (Thermo Fisher Scientific, США), о-Ксилол (Вектор, Россия); Тритон X-100 (PanReas AppliChem, Испания); Канадский бальзам (PanReas AppliChem, Испания), антитело против PTEN ab31392 (Abcam, Великобритания), Козий антикроличий IgG H&L ab205718 (Abcam, Великобритания), DAPI (Invitrogen, США), судан черный Б (PanReas AppliChem, Испания).

Оборудование

Термостат CH-100 (BioSan, Латвия); микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); амплификатор T100 (Bio-Rad Laboratories, США); амплификатор CFX96 (BioRad Laboratories, США); микроцентрифуга-вортекс микроспин fv-2400 (BioSan, Латвия); термостат WB-4MS типа водяная баня (BioSan, Латвия); рН-метр ST2100-E (Ohaus, США), световой исследовательский микроскоп ZEISS Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Растворы

Лизирующий буфер (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3 %-й саркозил, 0,1 %-й 2-меркаптоэтанол, 25 мМ ацетат натрия); элюирующий буфер (10 мМ Трис-НС1 рН-7,5, 1 мМ ЭДТА); промывочный буфер (0,1 % Triton X-100, фосфатно-солевой буфер рН-6,5); блокирующий буфер (1 %-й бычий сывороточный альбумин, фосфатно-солевой буфер рН-6,5); цитратный буфер (дигидрат цитрата натрия 0,0825 М, лимонная кислота 0,0175 М).

2.2 Характеристика клинического материала

Образцы опухолевой и условно-нормальной ткани легкого для определения экспрессии AhR, CYP1A1, микроРНК, PTEN, PD-L1

В условиях ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер» на базе онкологического отделения № 3 (г. Новосибирск, Россия) 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). После удаления части или всего легкого с опухолью (лобэктомия, билобэктомия, пульмонэктомия) у каждого пациента в максимально короткий временной промежуток (3–5 мин) производился забор опухолевого материала объемом 1 см³. Также из этого макропрепарата в качестве контроля забирался участок максимально удаленный от опухолевого узла визуально неизменной легочной ткани объемом 1 см³ (условно-нормальная легочная ткань). Образцы собирали в раствор RNeasy Lysis Solution («Qiagen», США) и хранили при –70 °С непосредственно до использования.

Для всех пациентов были получены клиничко-анамнестические данные с помощью специально разработанных индивидуальных анкет, включающих в

себя: данные о возрасте; диагноз с указанием стадии заболевания, гистологического подтипа опухоли, наличия или отсутствия драйверных мутаций (только для аденокарциномы), объема выполненного оперативного вмешательства, данных о предоперационном и/или послеоперационном специальном лечении (химиотерапия, лучевая терапия); данные о статусе курения, длительности и интенсивности курения; наличие соматических сопутствующих заболеваний, наследственного анамнеза; сведений о воздействии профессиональных вредностей, наличии синхронных или метакронных злокачественных опухолей.

Забор материала проводили при письменном согласии пациента, факт забора материала занесен в протокол согласно стандартам этического комитета Российской Федерации. Все экспериментальные процедуры были одобрены биоэтическим комитетом ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Клинические образцы для оценки возможностей «жидкой» биопсии

Группа 1: забирались попарно образцы крови до операции и фиксированные формалином парафиновые блоки (FFPE) опухолевой ткани после хирургического вмешательства у 20 пациентов с НМРЛ. Образцы были забраны в ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер» (ГБУЗ НСО «НОКОД», Новосибирск, Россия).

Группа 2: забиралась кровь от 16 пациентов, больных НМРЛ, с положительным статусом по мутации в гене *EGFR*, получавших ингибиторы тирозинкиназы (ИТК). Данные образцы были собраны в ГБУЗ НСО «НОКОД» (Новосибирск, Россия) и НИИ онкологии (Томск, Россия). Кроме этого, образцы крови были забраны от 12 здоровых добровольцев (6 мужчин и 6 женщин) в медицинском центре «Статус» (Новосибирск).

Кровь собирали в пробирки Vacutainer объемом 8 мл с раствором ЭДТА и хранили при +4 °С до приготовления плазмы. Плазму готовили в день забора крови центрифугированием в течение 10 мин при 2 000 g при 4 °С. Плазму разливали в пробирки по 0,5–1,0 мл и хранили при температуре –70 °С.

Клинический материал для эпидемиологического анализа

При выполнении работы был собран, систематизирован и проанализирован материал по историям болезни и/или амбулаторным картам пациентов, проходивших лечение, наблюдение или консультативный прием в Новосибирском областном клиническом онкологическом диспансере (ГБУЗ НСО «НОКОД») в период 2015–2019 гг. В исследование вошли пациенты с установленными диагнозами НМРЛ – плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) и аденокарцинома (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. Из них 4 758 мужчин и 1 298 женщин, средний медианный возраст выборок составил 66,54 года (мужчины – 66,06, женщины – 68,49). Для исследования структуры выживаемости в зависимости от стадии заболевания, возраста заболевшего, половой принадлежности пациента, гистологического типа ПКРЛ или АКЛ сравнивались показатели в категоризованных подгруппах с помощью статистических методов. Общая выборка пациентов была подразделена на две подгруппы по гистологическому типу НМРЛ: ПКРЛ и АКЛ. Далее подгруппы ранжировались по изучаемому фактору: на стадии (от I до IV), на возрастные категории (до 50 лет, 51–60 лет, 61–75 лет, старше 75 лет), по половой принадлежности. Для изучения влияния фактора курения на развитие рака легкого проанализированы пациенты с ПКРЛ (648 случаев) и с АКЛ (706 случаев). В выборку были включены данные за период 2017–2019 гг., отобранные по признаку «длительное курение в анамнезе», в нее вошли пациенты с многолетним стажем курения с индексом курения (ИК) более 10 пачка/лет:

$$\text{ИК} = \frac{\text{количество лет курения} * \text{количество выкуриваемых сигарет в день}}{20}$$

Для того, чтобы получить более точную статистику, пациенты с ИК менее 10 пачка/лет и бывшие курильщики в обработку не брались.

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» (г. Новосибирск, Россия) в онкологическом отделении № 3 в период 2013–2017 гг. Всего было включено 549 пациентов, из них мужчин – 352, женщин – 197. Определялись активирующие мутации в 18–21 экзонах гена *EGFR* методом ПЦР в режиме реального времени с помощью набора Cobas EGFR Mutation Test в лаборатории фармакогеномики ФГБУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН». Произведен анализ клинических данных у всех пациентов по возрасту, полу, статусу курения.

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, ША, а также операционный опухолевый материал от больных с НМРЛ, полученный в ГБУЗ НСО «НОКОД» (г. Новосибирск, Россия) во время планового радикального оперативного вмешательства в онкологическом отделении № 3 (17 мужчин, 3 женщины), средний возраст $60,7 \pm 1,5$. Критерием включения являлось отсутствие химио- и/или радиотерапии до оперативного вмешательства. От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования.

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). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными» (ГОСТ 33215-2014). Крысам внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл

раствора бензо(а)пирен («Sigma-Aldrich», США) в подсолнечном масле согласно следующим схемам: однократное введение (доза 75 мг/кг) с последующей инкубацией в течение 24, 48 и 72 часов (n = 4); хроническое введение (дозы 10 и 50 мг/кг) в течение 12 недель с периодичностью инъекций 1 раз в неделю (n = 4). Контрольным группам крыс вводили по 0,5 мл/особь подсолнечного масла.

2.3 Биоинформатические методы исследования

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>) для определения экспрессии мРНК *AhR* и его репрессора *AhRR*, уровня метилирования промоторов генов *AhR* и *AhRR*, изменения уровней экспрессии классических генов-мишеней *AhR* (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*), изменения уровня экспрессии гена *CD274*, уровня мРНК *PTEN* в опухолях НМРЛ в сравнении с нормальной тканью с учетом статуса курения. По данным TCGA произведен анализ выживаемости пациентов с НМРЛ в зависимости от экспрессии *AhR* и *AhRR* [354, 355].

2.4 Методы молекулярного исследования на опухолевых образцах пациентов с немелкоклеточным раком легкого

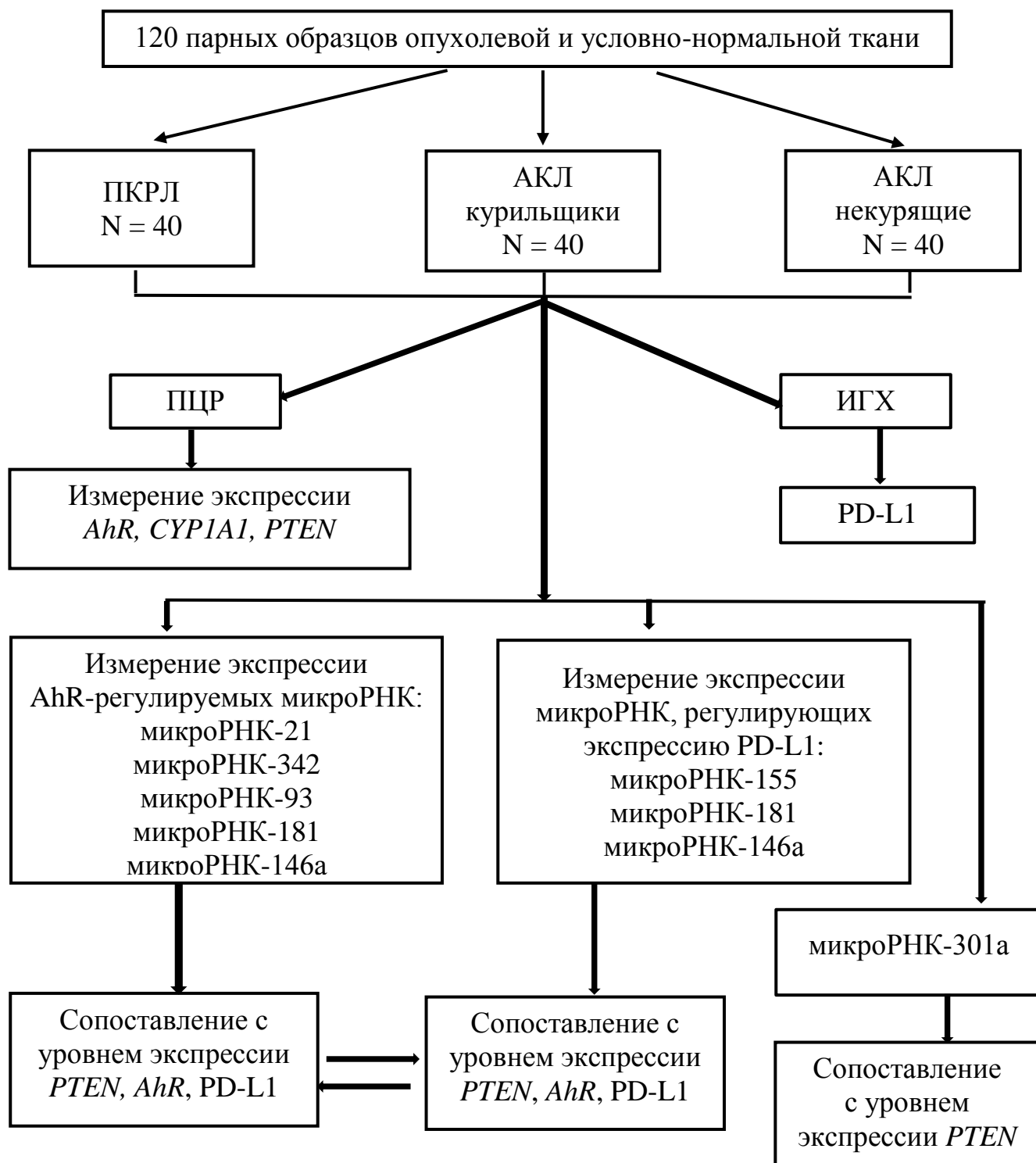


Рисунок 19 – Дизайн молекулярных методов на опухолевых образцах пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Выделение РНК

Выделение РНК производили из замороженных образцов легких крыс, опухолевой и условно-нормальной ткани легкого человека (~ 30–50 мг). В качестве контроля использовали отдаленную от опухоли условно здоровую ткань легких. Ткань гомогенизировали в фарфоровой ступке с 1 мл реактива TRIzol® (Thermofisher Scientific) в жидком азоте. Гомогенат переносили в пробирку и инкубировали не менее 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 200 мкл хлороформа, встряхивали и центрифугировали (12 000 g, 15 мин, 4 °C). После отбирали водную фазу и осаждали РНК 500 мкл изопропанола, дважды промывали 75 %-м этанолом и растворяли в воде, свободной от нуклеаз. Качество выделенной РНК оценивали по отношению поглощения A260 / A280 и A260 / A230, а также с применением электрофореза в агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Выделение микроРНК из образцов опухолей и условно-нормальной ткани легкого человека и легких крыс

В пробирку с 500 мкл лизирующего раствора добавляли около 50 мг нормальной или опухолевой ткани. В течение 10 минут соответствующую ткань в растворе инкубировали при температуре 65 °C и после центрифугировали 2 минуты со скоростью 10 000 тысяч оборотов в минуту. Далее, отобранный супернатант переносили в пробирку с 500 мкл изопропанола и 10 мкл сорбента. В течение 5 минут полученный раствор перемешивали и инкубировали при комнатной температуре. Затем 10 минут раствор центрифугировали со скоростью 10 000 тысяч оборотов в минуту. После чего осадок отмывали в 500 мкл 70 %-ого этанола, затем в 300 мкл ацетона. В течение 30 минут осадок сушили при комнатной температуре, после чего добавляли 200 мкл элюирующего буфера и перемешивали.

ПЦР с обратной транскрипцией для мРНК и микроРНК

Для определения уровней мРНК выбранных генов проводили обратную транскрипцию с использованием 1 мкг выделенной тотальной РНК. Реакцию проводили с использованием набора ОТ-М-MuLV-RH (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 (Таблица 5).

Таблица 5 – Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных праймеров для мРНК генов

| Ген | Праймер | Последовательности праймеров |
|------------|----------|-------------------------------|
| rno-АСТВ | прямой | 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3' |
| | обратный | 5'-GATGCCGTGCTCGATGGGGT-3' |
| rno-АНР | прямой | 5'-СТТГТТАСАСГСГСГТГААТГГ-3' |
| | обратный | 5'-ТГАГГГГТТТАГАСГССАГТ-3' |
| rno-СУР1А1 | прямой | 5'-СТТСАСАСТТАТСГСТААТГГ-3' |
| | обратный | 5'-ТТГГГТСТГАГГСТАТГГ-3' |
| rno-СУР1В1 | прямой | 5'-GAGTTGGTGGCAGTGTTG-3' |
| | обратный | 5'-GCATCGTCGTGGTTGTAC-3' |
| rno-EGFL7 | прямой | 5'-GAATGAAGGGAGTTGCATCC-3' |
| | обратный | 5'-GACACCTGGCCTCTCCTGTA-3' |
| rno-ЕМР2 | прямой | 5'-TCGTGTCTACGGCACTCTTG-3' |
| | обратный | 5'-CTGCATCACAGAGTAACTGAA-3' |
| rno-НРТ1 | прямой | 5'-СТТССТССТСАСАСГСГТТ-3' |
| | обратный | 5'-AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTGTC-3' |

Продолжение таблицы 5

| Ген | Праймер | Последовательности праймеров |
|-------------|----------|----------------------------------|
| rno-IGF1 | прямой | 5'-CGCTTCAGTTTGTCTGTTCG-3' |
| | обратный | 5'-GCAGCACTCTTCCACGATG-3' |
| rno-IGF2 | прямой | 5'-CAAATTCGACACCTGGAGACA-3' |
| | обратный | 5'-TTGCTGGACATCTCCGAAGAG-3' |
| rno-ITGA6 | прямой | 5'-GAAGTGAGGACCCTTGCTGATG-3' |
| | обратный | 5'-CGAACCTGTGCCTTAGTGACAA-3' |
| rno-PTEN | прямой | 5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3' |
| | обратный | 5'-TTGTCATTATCCGCACGCTC-3' |
| rno-SLC34A2 | прямой | 5'-TGGTTGCCTCCTCCTTGCT-3' |
| | обратный | 5'-GCAGCCTCCAGAGGTAAGAG-3' |
| hsa-AHR | прямой | 5'-TTCCACCTCAGTTGGCTTTG-3' |
| | обратный | 5'-GGACTCGGCACAATAAAGCA-3' |
| hsa-CYP1A1 | прямой | 5'-CAAGAGGAGCTAGACACAGTGATT-3' |
| | обратный | 5'-AGCCTTTCAAACCTTGTGTCTCTTGT-3' |
| hsa-GAPDH | прямой | 5'-ACAACCTTGGTATCGTGGAAGGAC-3' |
| | обратный | 5'-CAGGGATGATGTTCTGGAGAGC-3' |
| hsa-POLR2A | прямой | 5'-GCATGGCAGAGGAGTTTCGGCT-3' |
| | обратный | 5'-ATTTCCCCGGGATGCGCAATGG-3' |
| hsa-PTEN | прямой | 5'-GTTTACCGGCAGCATCAAAT-3' |
| | обратный | 5'-CCCCACTTTAGTGACACAGT-3' |

Для определения экспрессии микроРНК сначала проводили обратную транскрипцию с использованием обратной транскриптазы M-MuLV-RN (ООО «Биолабмикс», Россия) и «stem-loop» праймеров, которые были специфичны для соответствующих последовательностей выбранных микроРНК, полученных из miRBase (Таблица 6).

Таблица 6 – Последовательности праймеров для обратной транскрипции микроРНК

| Ген | Последовательность праймеров |
|--------------------|--|
| U6 | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATATG-3' |
| U48 | 5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACGGTCAG-3' |
| U44 (человек) | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTCAGTT-3' |
| U87 (крыса) | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTCAGTC-3' |
| miR-22- 3p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGTT-3' |
| miR-21- 5p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATC-3' |
| miR-29a- 3p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAACCGAT-3' |
| miR-126- 3p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCGATTAT-3' |
| miR-342- 3p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACGGGTG-3' |
| miR- 181a-5p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCACCG-3' |
| miR-155- 5p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCCCTA-3' |
| miR- 146a-5p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCCAT-3' |
| miR-93- 5p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTACCTGC-3' |
| miR- 301a-3p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATGCTTTG-3' |
| mo-miR- 193b-5p | 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTCGCCC-3' |
| mo-miR- 483-3p | 5'-GTCGTATCCAGTGCACCCTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAAGACG-3' |

ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, с применением технологии TaqMan (краситель R6G, тушитель BHQ1) 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. Последовательности праймеров представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Нуклеотидные последовательности праймеров для полимеразной цепной реакции микроРНК

| Наименование | Праймер | Последовательности праймеров |
|------------------|----------|--|
| U6 | прямой | 5'-GCTTCGGCAGCACATATAC-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAAAATATG-(BHQ1)-3' |
| U48 (человек) | прямой | 5'-GAGTGATGATGACCCCAGGTAA-3' |
| | обратный | 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACCAGAGCCAACGGTCAG-(BHQ1)-3' |
| U44 (человек) | прямой | 5'-GCCGCTCTTAATTAGCTCT-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAGTCAGTT-(BHQ1)-3' |
| U87 (крыса) | прямой | 5'-GCCGCAGAGAGAATCTTAA-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGCTCAGTC-(BHQ1)-3' |
| miR-22-3p | прямой | 5'-GCCGCAAGCTGCCAGTTGAAG-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACAGTT-(BHQ1)-3' |

Продолжение таблицы 7

| Наименование | Праймер | Последовательности праймеров |
|----------------|----------|--|
| miR-21-5p | прямой | 5'-GCCGCTAGCTTATCAGACT-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAACATC-(BHQ1)-3' |
| miR-29a-3p | прямой | 5'-GCCGCTAGCACCATCTGAA-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTAACCGAT-(BHQ1)-3' |
| miR-126a-3p | прямой | 5'-GCCGCTCGTACCGTGAGTA-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCGCATTAT-(BHQ1)-3' |
| miR-342-3p | прямой | 5'-GCCGCTCTCACACAGAAATCG-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACGGGTGC-(BHQ1)-3' |
| miR-181a-5p | прямой | 5'-GCCGCAACATTCAACGCTGT-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACTCACCG-(BHQ1)-3' |
| miR-155-5p | прямой | 5'-GCCGCTTAATGCTAATCGTG-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAACCCCTA-(BHQ1)-3' |
| miR-146a-5p | прямой | 5'-GCCGTGAGAACTGAATTCC-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAACCCAT-(BHQ1)-3' |
| miR-93-5p | прямой | 5'-GCCGCCAAAGTGCTGTTCGT-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCTACCTGC-(BHQ1)-3' |
| miR-301a-3p | прямой | 5'-GCCGCCAGTGCAATAGTATT-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACATGCTTTG-(BHQ1)-3' |
| mo-miR-193b-5p | прямой | 5'-GCCGCGGGGTTTTGA-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCTCGCCC-(BHQ1)-3' |

Окончание таблицы 7

| Наименование | Праймер | Последовательности праймеров |
|----------------|----------|--|
| hno-miR-483-3p | прямой | 5'-GCCGCCACTCCTCCCTGC-3' |
| | обратный | 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' |
| | зонд | 5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACAAGACG-(BHQ1)-3' |

Выделение ДНК из плазмы крови для оценки возможностей «жидкой» биопсии

Выделение свободно-циркулирующей ДНК производилось из 1,0 мл плазмы крови с использованием набора «PME free-circulating DNA Extraction Kit» (Analytik Jena, Germany). Далее свободно-циркулирующую ДНК растворяли в 50 мкл воды для ПЦР и хранили при температуре -20°C . Концентрацию свободно-циркулирующей ДНК оценивали с помощью ПЦР в реальном времени для 21 экзона гена *EGFR* с использованием контрольной реакции смеси для ПЦР из набора «Real-time-PCR-EGFR-7RP Kit» (Биолинк, Россия) и ДНК человеческой плаценты (2 нг/л) в качестве внешнего контроля. Средняя концентрация свободно-циркулирующей ДНК в плазме составляла $(9,3 \pm 14)$ нг/мл (диапазон 0,5–81,0 нг/мл). В нескольких образцах концентрация свободно-циркулирующей ДНК была выше 250 нг/мл, эти образцы имели розовую окраску из-за гемолиза и были исключены из дальнейшего анализа.

Мультиплексную ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси с 1-кратным буфером для Taq-ДНК-полимеразы; 0,2 ммоль каждый из dATP, dGTP, dTTP, dCTP; 1,5 ммоль MgCl_2 ; 0,5 мкмоль каждого прямого и обратного праймеров для 18–21 экзона гена *EGFR* 2,0 ед. Taq ДНК-полимеразы (Биолинк) и 20 мкл свободно-циркулирующей ДНК из плазмы крови (Таблица 8).

Таблица 8 – Последовательности олигонуклеотидных праймеров для мультитиплесной полимеразной цепной реакции 18–21 экзона гена *EGFR*

| Экзон | Праймер | Последовательности праймеров | Размер ампликона, в. п. |
|-------|----------|------------------------------|-------------------------|
| 18 | прямой | 5'-TCCCAACCAAGCTCTCTTGA-3' | 109 |
| | обратный | 5'-CTGTGCCAGGGACCTTACC-3' | |
| 19 | прямой | 5'-TGGATCCCAGAAGGTGAGAAAG-3' | 118 |
| | обратный | 5'-CCCACACAGCAAAGCAGAA-3' | |
| 20 | прямой | 5'-CCTCCCTCCAGGAAGCCTA-3' | 116 |
| | обратный | 5'-GCCGAAGGGCATGAGCTG-3' | |
| 21 | прямой | 5'-CCGCAGCATGTCAAGATCAC-3' | 115 |
| | обратный | 5'-AATGCTGGCTGACCTAAAGC-3' | |

Мультиплексную ПЦР проводили в iCycler iQ5 (BioRad) по следующему протоколу: 1 цикл – 95 °С 3 мин; 8–12 циклов – 95 °С 15 сек, 58 °С 30 сек, 72 °С 20 сек; 1 цикл – 72 °С 3 мин. После мультиплексной ПЦР реакционную смесь разводили 1 : 25 в воде для ПЦР и 5 мкл использовали для количественной ПЦР.

Выявление мутаций в гене EGFR в свободно-циркулирующей ДНК методом ПЦР в реальном времени

Ампликоны после мультиплексной ПЦР последовательностей *EGFR* в свободно-циркулирующей ДНК были протестированы на наличие мутаций в гене *EGFR*, таких как L858R, L861Q, G719A/C/S, S768I, T790M и делеции в экзоне 19 с использованием набора «Real-time-PCR-EGFR-7RP» (Биолинк, Россия). В наборе аллель-специфическая количественная ПЦР использовалась для выявления мутаций L858R, L861Q, G719A/C/S, S768I, T790M и wild-type blocking ПЦР для обнаружения делеций в экзоне 19.

2.5 Иммунофлуоресцентное исследование

Стекла с парафиновыми срезами НМРЛ исследовали методом иммунофлуоресценции. Для регидратации помещали стекло со срезом в ксилол

(3 смены по 5 минут). Затем, предварительно тщательно осушив, стекло со срезом помещали в 100 %-й этанол (2 смены по 10 минут). Осушив, опускали в 95 %-й этанол (2 смены по 10 минут). Далее, осушив стекло с образцом, помещали его в 80 %-й этанол на 3 минуты. Осушив стекло, ставили его в дистиллированную воду (2 смены по 5 минут). На второй стадии подвергали срезы термоиндуцированному извлечению эпитопа, используя 10 мМ цитратный буфер (рН 6,0) в течение 15 минут при 98 °С. После срезы промывали дважды в воде и один раз в TBS, содержащем 0,025 % Triton X-100 (TBS-T) по 5 минут. Затем вокруг образца создавали гидрофобный барьер. Далее проводили блокировку в течение 60 минут при комнатной температуре во влажной камере с TBS и 100–400 мкл блокирующего раствора – 1 % BSA. По истечению времени удаляли блокирующий раствор и инкубировали ночь при 4 °С во влажной камере с первичными антителами, разведение 1 : 200 (разведение выбиралось по данным с сайта производителя антител). Далее проводили инкубацию с вторичными антителами с флуоресцентной меткой в течение 30–50 минут при комнатной температуре во влажной камере. Разведение 1 : 300. Промывали в TBS (4 раза по 5 минут), и инкубировали 30 минут с 0,5 %-м раствором судана черного Б в TBS. Далее срез промывали водой и затем ксилолом 3 раза по 5 минут. Регидрировали и наносили заключительную среду с DAPI и фиксировали. Для количественной оценки уровня белка был разработан метод, основанный на расчете средней интенсивности флуоресцентного сигнала на клетку. На срезе выбирались гистологически однородные участки, характерные для изучаемого объекта. С данного участка делали снимок распределения флуоресцентной метки изучаемого белка. Далее в графическом редакторе производился подсчет процентного содержания фона I_{blank} (места отсутствия метки) и всех остальных оттенков серого I_{fluor} (места с наличием метки). Из процентного содержания черного цвета рассчитывается процентное содержание метки: $I_{\text{fluor}} = (100 - I_{\text{blank}})$, %. С того же участка делался снимок распределения DAPI в ядрах клеток, по которому производился расчет количества ядер. Данное значение обозначили как N_{nuclear} (шт. ядер). Интенсивность флуоресцентного сигнала f

рассчитывали, как: $f = (100 - I_{\text{blank}}) / N_{\text{nuclear}}$, (% / шт. ядер). Далее велся расчет относительной интенсивности F для опухоли с низким содержанием PD-L1 и AhR (t) относительно опухоли с высоким содержанием PD-L1 и AhR (n) для флюоресцентной метки исследуемого белка x: $F_x^t = f_x^t / f_x^n$

2.6 Иммуногистохимическое исследование

Методика иммуногистохимического окрашивания использовалась для оценки белка PTEN в срезах тканей АКЛ человека, фиксированных формалином и залитых парафином. Данный процесс состоял из нескольких этапов:

- депарафинизация среза на стекле с помощью нисходящей колонки спиртов (ксилол – 3 минуты; этиловый спирт 96 % об. – 2 минуты; этиловый спирт 70 % об. – 2 минуты; этиловый спирт 40 % об. – 2 минуты; вода дистиллированная – 2 минуты);
- обработка TBS (Трис-буфер солевой: 0,05 М Трис/HCl, 0,15 М NaCl) pH 7,4 – 5 минут;
- демаскировка эпитопов белков путем выдерживания в цитратном буфере 0,1 М pH 6,0 – 30 минут на водяной бане при 95 °С;
- обработка TBS pH 7,4 – 5 минут;
- блокировка эндогенной пероксидазы водным раствором перекиси водорода (массовая доля H₂O₂ 3 %) – 30 минут;
- двукратная обработка TBS pH 7,4 – 5 минут;
- обработка первичными антителами (рекомбинантные антитела) против PTEN (ab32199, Abcam), разведение в TBS (pH 7,4) 1 : 1 000 – 30 минут;
- двукратная обработка TBS pH 7,4 – 5 минут;
- обработка вторичными антителами (ab205718, Abcam), разведение в TBS (pH 7,4) 1 : 20 000 – 30 минут;
- двукратная обработка TBS pH 7,4 – 5 минут;
- обработка хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин 0,05 %, TBS pH 7,4, перекись водорода 1 %) – 30 минут;

- усиление окраски сульфатом меди (CuSO_4 0,5 %, NaCl 0,9 %) – 10 минут;
- отмывка NaCl 0,9 % – 1 минута;
- окрашивание гематоксилином Карацци 0,1 % – 2 минуты, вода проточная – 2 минуты;
- обезвоживание среза на восходящей колонке спиртов (вода дистиллированная – 1 минута; этиловый спирт 40 % об. – 2 минуты; этиловый спирт 70 % об. – 2 минуты; этиловый спирт 96 % об. – 2 минуты; ксилол – 3 минуты);
- заключение в канадский бальзам под покровное стекло.

Определение экспрессии PD-L1 в опухолевых образцах, полученных от пациентов с НМРЛ осуществляется методом ИГХ путем подсчета соотношения опухолевых клеток с позитивным окрашиванием мембраны к общему количеству опухолевых клеток (TPS – tumor proportion score), результат выражался в процентах от 0 до 100. Были использованы антитела производства Dako – PD-L1 22C3. Тестирование проводилось на платформе Dako Autostainer Link 48.

2.7 Фенотипическая и функциональная характеристика подтипов дендритных клеток периферической крови больных с немелкоклеточным раком легкого

Определение относительного количества миелоидных и плазмцитоидных 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). Подтипы дендритных клеток периферической крови характеризовались следующим фенотипом: миелоидные (мДК) ($\text{CD}3^-$; $\text{CD}14^-$; $\text{CD}19^-$; $\text{CD}45^+$; HLA-DR^+ ; $\text{BDCA}1^+$; $\text{BDCA}2^-$) и плазмцитоидные (пДК) ($\text{CD}3^-$; $\text{CD}14^-$; $\text{CD}19^-$; $\text{CD}45^+$; HLA-DR^+ ; $\text{BDCA}1^-$; $\text{BDCA}2^+$); $\text{CD}3\text{-FITC}$, $\text{CD}19\text{-FITC}$,

HLA-DR-PE («Сорбент», Россия); CD14-FITC, CD45-V-450 («BD Bioscience», США); BDCA1-APC, BDCA2-PerCP-C5.5 («BioVision», 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).

2.8 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов ПЦР проводилась с помощью программ MS Office, STATISTICA (версия 12) и Origin. Результаты, полученные на модели экспериментальных животных, представлены в виде $N \pm SD$, где N – среднее, SD – стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий между выборками использовался t-критерий Стьюдента. Результаты, полученные на образцах опухолей человека, рассчитывали по критерию Манна – Уитни. Результаты представлены в виде: медиана, диапазон, достоверность различий между параметрами. Для проверки наличия корреляции между уровнями экспрессии микроРНК и PTEN рассчитывался коэффициент корреляции Спирмена. Результаты представлены в виде: медиана, диапазон, достоверность различий между параметрами.

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, где оценка выживаемости основана на произведении вероятностей выживаемости в настоящий момент времени на вероятность выживаемости в следующий момент времени, когда событие (смерть) не наступило. Соответственно, были сделаны следующие допущения: цензурированные случаи не влияют на прогноз выживаемости;

оценки выживаемости одинаковы для данных, включенных на всех временных сроках исследования; оцениваемое событие происходит непосредственно в анализируемый момент времени. Основная математическая функция, непосредственно применяемая в анализе выживаемости, выглядит как произведение отношений вероятностей: в числителе – отношения разницы между общим числом случаев и числом наступивших событий; в знаменателе – общее число событий в данный момент. Графики функции выживания, представленной на рисунках, показывают в каждой своей точке кумулятивную вероятность наступления события (летальности) для каждого нецензурированного случая [4, 8, 13, 15]. Для изучения влияния определенного фактора на медиану выживаемости в подгруппах мы использовали непараметрические критерии: логарифмический ранговый, обобщенный Геханом критерий Уилкоксона, многовыборочный критерий хи-квадрат с процедурой Ментеля для сравнения времен жизни. При использовании логарифмического рангового критерия были сделаны следующие допущения: выживаемость в группах сравнения одинакова и различия случайны; выбывание в обеих выборках одинаково; функции выживаемости выборок определяются отношением $S_2(t) = [S_1(t)]\Psi$, где Ψ – отношение смертности. Если Ψ равна нулю, выживаемость сравниваемых выборок одинакова и изучаемый фактор влияния не оказывает. Соответственно, при значениях Ψ больше или меньше нуля выживаемость в исследуемых группах больше или меньше относительно друг друга и, таким образом, фактор оказывает значимое влияние. Тестовая статистика представляет собой отношение суммы разности наблюдаемого и ожидаемого числа событий в определенный момент времени к сумме дисперсии в каждый определенный момент времени. Данный тест рассчитывался в стандартных процедурах пакета, как описано ранее [6, 8, 17]. Для сравнения выборок по выживаемости, категоризованных в соответствии с изучаемым фактором, также применялся обобщенный критерий Уилкоксона – Гехана. Метод не требует равенства отношения $S_2(t) = [S_1(t)]\Psi$. Идея метода представляет собой сравнение времени жизни пациентов, принадлежащих к разным подгруппам, распределенных с учетом фактора

влияния, и присвоение этим разностям значений -1 , 0 , $+1$ в зависимости от полученного знака разности. Далее тестовая статистика (Z) представляет собой отношение суммы всех разностей в числителе и стандартную ошибку в знаменателе. Степень отличия от нуля показывает достоверное или недостоверное влияние фактора. Поскольку в одной группе признака-фактора выживаемость сравнивалась по нескольким подгруппам, основным методом, применяемым в исследовании, был многовыборочный критерий хи-квадрат с процедурой Менделя для сравнения времен жизни, встроенный в пакет анализа. Данный метод представляет собой обобщение нескольких критериев и процедур: логарифмического рангового, критериев Уилкоксона – Гехана, Уилкоксона – Пето. Прежде всего каждому времени жизни рассчитывался его вес (вклад) в общую выживаемость при помощи процедуры Менделя. Тестовая статистика основывается на расчете отношения суммы квадратов разностей между наблюдаемым весом времени жизни и ожидаемым к оценке дисперсии в знаменателе.

При характеристике подтипов дендритных клеток статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы «Statistica 6.0». Данные представлены в виде медианы и диапазона значений квартилей (25 % и 75 %). Для проверки гипотез о достоверности различий использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В пояснениях к иллюстрациям количество лиц в группе обозначено как n .

2.9 Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения или принятой практике для таких исследований.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Оценка влияния разных факторов на выживаемость у пациентов с немелкоклеточным раком легкого в Новосибирской области

Структура заболеваемости и смертности от РЛ в Новосибирской области (НСО)

По результатам анализа заболеваемости и смертности от рака легкого в НСО за 12 лет (2010–2021 гг.) было отмечено снижение заболеваемости среди населения для обоих полов с 53,2 на 100 тыс. населения в 2010 году до 36,76 на 100 тыс. населения в 2021 году. Надо отметить, что более значимое снижение заболеваемости наблюдалось у мужчин – с 95,34 на 100 тыс. населения в 2010 году до 62,62 на 100 тыс. населения в 2021 году, тогда как у женщин – с 17,33 на 100 тыс. населения в 2010 году до 14,25 на 100 тыс. населения в 2021 году (Таблица 9) [9, 10].

Таблица 9 – Заболеваемость раком легкого в Новосибирской области

| Годы | Оба пола на 100 тыс. населения | | мужчины на 100 тыс. населения | | женщины на 100 тыс. населения | |
|------|-----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
| | абс. | грубый | абс. | грубый | абс. | грубый |
| 2010 | 1 410 | 53,21 | 1 162 | 95,34 | 248 | 17,33 |
| 2011 | 1 309 | 48,90 | 1 050 | 84,36 | 259 | 18,09 |
| 2012 | 1 357 | 50,30 | 1 109 | 88,32 | 248 | 17,19 |
| 2013 | 1 374 | 50,51 | 1 128 | 89,05 | 246 | 16,92 |
| 2014 | 1 512 | 55,20 | 1 206 | 94,56 | 306 | 20,91 |
| 2015 | 1 494 | 54,24 | 1 211 | 94,44 | 283 | 19,22 |
| 2016 | 1 425 | 51,43 | 1 140 | 88,38 | 285 | 19,24 |
| 2017 | 1 464 | 52,58 | 1 154 | 89,03 | 310 | 20,83 |
| 2018 | 1 432 | 51,31 | 1 105 | 85,05 | 327 | 21,92 |
| 2019 | 1 354 | 48,43 | 1 039 | 79,84 | 315 | 21,08 |
| 2021 | 1 023 | 36,76 | 811 | 62,62 | 212 | 14,25 |

В отношении смертности от РЛ в НСО выявлена аналогичная зависимость, как и в случае с заболеваемостью. Так показатель смертности для обоих полов имеет тенденцию к снижению с 43,29 на 100 тыс. населения в 2010 году до 40,96 на 100 тыс. населения в 2021 году. Снижение смертности отмечено среди мужского населения – с 78,77 на 100 тыс. населения в 2010 году до 70,18 на 100 тыс. населения в 2021 году, тогда как у женщин есть тенденция к росту смертности – с 13,07 на 100 тыс. населения в 2010 году до 15,53 на 100 тыс. населения в 2021 году (Таблица 10) [9,10].

Таблица 10 – Смертность от рака легкого в Новосибирской области

| Годы | Оба пола на 100 тыс. населения | | Мужчины на 100 тыс. населения | | Женщины на 100 тыс. населения | |
|------|-----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
| | абс. | грубый | абс. | грубый | абс. | грубый |
| 2010 | 1 147 | 43,29 | 960 | 78,77 | 187 | 13,07 |
| 2011 | 1 147 | 42,85 | 951 | 76,41 | 196 | 13,69 |
| 2012 | 1 072 | 39,73 | 897 | 71,43 | 175 | 12,13 |
| 2013 | 1 069 | 39,30 | 901 | 71,13 | 168 | 11,56 |
| 2014 | 1 167 | 42,61 | 972 | 76,21 | 195 | 13,32 |
| 2015 | 1 185 | 43,02 | 995 | 77,60 | 190 | 12,91 |
| 2016 | 1 152 | 41,57 | 946 | 73,34 | 206 | 13,91 |
| 2017 | 1 158 | 41,59 | 930 | 71,75 | 228 | 15,32 |
| 2018 | 1 187 | 42,53 | 967 | 74,43 | 220 | 14,75 |
| 2019 | 1 170 | 41,85 | 923 | 70,93 | 247 | 16,53 |
| 2021 | 1 140 | 40,96 | 909 | 70,18 | 231 | 15,53 |

Анализ выживаемости в зависимости от гистотипа опухоли

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) (Рисунок 20 а). Медиана выживаемость для пациентов с обеими гистотипами оказалась низкой и составила 486 дней (16 месяцев) (Таблица 11).

Для пациентов с ПКРЛ медиана выживаемости составила 14,5 месяца – 443 дня (Таблица 11), при квартильном диапазоне (25 % и 75 %) – от 138,0 до 1 240,6 дня (Рисунок 20 б). Для больных с АКЛ медиана выживаемости оказалась немного выше 18 месяцев (552,2 дня) и с характерным расширенным интервалом значений по нижнему и верхнему квартилям (107,4 и 1 511,2 дня) (Рисунок 20 б). Важно отметить, что для нижнего квартиля показатели выживаемости лучше для ПКРЛ (138 дней в сравнении с 107,4 дня), а для верхнего квартиля показатели выживаемости лучше для АКЛ (1 511,2 дня в сравнении с 1 240,6 дня) (Таблица 11). Двухлетняя выживаемость сопоставима для обеих гистотипов и составила для пациентов с ПКРЛ 32,67 %, для пациентов с АКЛ – 30,72 %.

Таблица 11 – Перцентили общей функции выживания при немелкоклеточном раке легкого и по подгруппам: для плоскоклеточного рака легкого и для аденокарциномы легкого по данным 2015–2019 гг.

| Перцентили кумулятивной выживаемости | Среднее значение выживаемости при НМРЛ, дни | |
|---|---|---------|
| | 25-й перцентиль (нижний квартиль) | 120,0 |
| 50-й перцентиль (медиана выживаемости) | 486,4 | |
| 75-й перцентиль (верхний квартиль) | 1 378,1 | |
| Для данных сгруппированных по гистологии: | для ПКРЛ | для АКЛ |
| 25-й перцентиль (нижний квартиль) | 138,0 | 107,4 |
| 50-й перцентиль (медиана выживаемости) | 443,0 | 552,2 |
| 75-й перцентиль (верхний квартиль) | 1 240,6 | 1 511,2 |

При сравнении медианных значений выживаемости для выборок ПКРЛ и АКЛ тестовая статистика свидетельствует о достоверном влиянии гистологического типа рака легкого на общую выживаемость пациентов (Рисунок 20 а, б; Таблица 12). Различие медианных значений данного показателя отличается в 1,24 раза в пользу АКЛ, хотя смещение временного ряда ПКРЛ относительно АКЛ небольшое, но достоверное (уровень значимости составляет

0,0164). Основная доля выживших (от 25 % до 75 %) и в случае ПКРЛ, и в случае АКЛ укладывается в период 3,7 года, размах отличается в 1,3 раза (см. таблицу 11).

Таблица 12 – Ранговый критерий Kruskal – Wallis (анализ зависимости выживаемости от гистологии немелкоклеточного рака легкого) по данным 2015–2019 гг.

| | | |
|-----------------------|--|--------------|
| Выживаемость (SURV_D) | Kruskal – Wallis ANOVA по рангам: переменная SURV_D (выживаемость, 2015–2019 гг.); независимая (группирующая) переменная HIST (гистология с кодами ПКРЛ и АКЛ). Тестовая статистика Kruskal – Wallis: $H(1, N = 6\ 056) = 5,760089; p = 0,0164$ | |
| | количество случаев | сумма рангов |
| ПКРЛ | 3 007 | 9 269 966 |
| АКЛ | 3 049 | 9 070 630 |

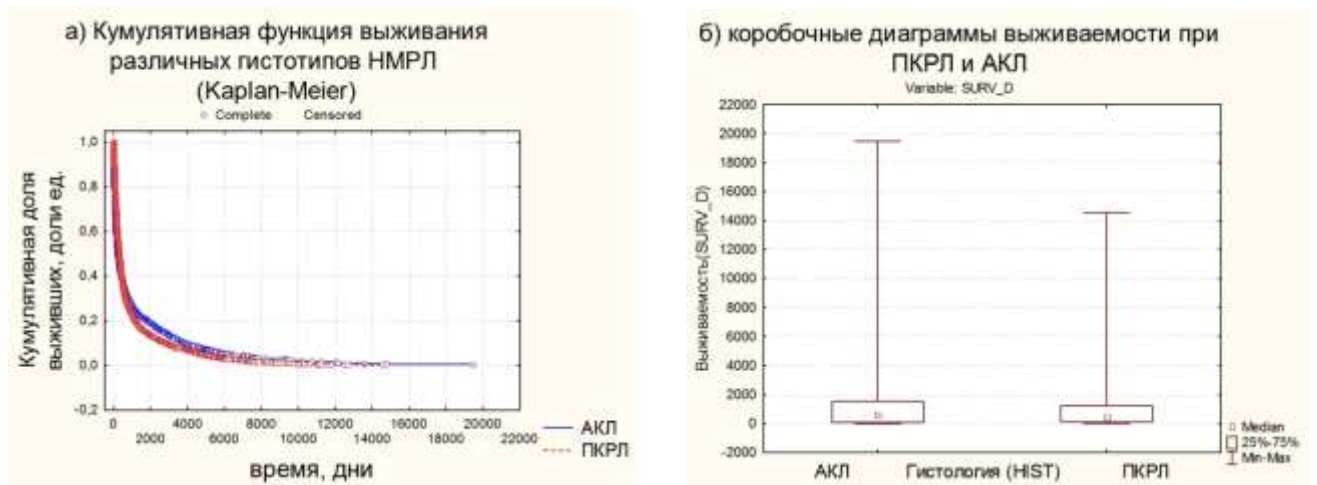


Рисунок 20 – Влияние гистотипа на выживаемость пациентов с немелкоклеточным раком легкого: а) – сравнение графиков функции выживания при плоскоклеточном раке легкого и аденокарциноме легкого; б) – различие в коробочных диаграммах для плоскоклеточного рака легкого и аденокарциномы легкого: медиана, 25 % и 75 % перцентили, размах

Влияние гистологии НМРЛ (в рамках исследования ПКРЛ и АКЛ), выражаемое в смещении медиан выживаемости выборок относительно друг друга, показало в целом более неблагоприятный прогноз при АКЛ, чем при ПКРЛ. Что касается детального понимания влияния гистологического типа НМРЛ (ПКРЛ или АКЛ) на медиану выживаемости в группах ранжированных пациентов, замечена неоднозначность проявления гистологии в разрезе структуры, для АКЛ характерен больший размах, большее среднее значение (см. рисунок 20). Также обнаружилось, что для мужчин гистотип НМРЛ не однозначно сказывается по возрастным подгруппам: наблюдается высокая достоверность влияния на выживаемость только в категории старше 75 лет – более 99,999 % ($Z = -3,61254$; $p = 0,00030$) (Таблица 13).

Для женщин гистотип НМРЛ с доверительной вероятностью более 99,999 % влияет на выживаемость ($p = 0,00009$), что касается влияния гистотипа на медиану выживаемости по возрастным подгруппам в целом, то в нашей работе было показано такое влияние, начиная с возраста 61 год и старше, где уровень значимости равен 0,00001 (Таблица 13). Проверка гипотезы о влиянии гистологического типа НМРЛ на выживаемость при определенной стадии заболевания (двувывборочный критерий Уилкоксона – Гехана) выявила зависимость выживаемости от гистологического типа только на IV стадии ($p = 0,000001$); медиана выживаемости пациентов с АКЛ на этой стадии была 80 дней, при ПКРЛ – 104 дня.

Таблица 13 – Сравнение выборок пациентов с плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой легкого критерием хи-квадрат с процедурой Ментеля по данным 2015–2019 гг.

| Группы сравнения | Переменная: количество дней, вычисленное на основе данных (столбец характеристика данных). Переменная с индикатором цензуры: подвергнута цензуре. Группирующая переменная: гистология | |
|---|---|--|
| | Характеристика данных | Тестовая статистика и уровень значимости |
| Группа, категорированная по полу: мужчины с ПКРЛ и АКЛ | Общее количество: наблюдений 4 758; достоверных наблюдений: 4 723, из них – без цензуры: 4 495 (95,17 %) цензура: 228 (4,83 %) | $Z = -2,53470$ $p = 0,01125$ |
| Группа, категорированная по полу: Женщины с ПКРЛ и АКЛ | Общее количество: наблюдений 1 298; достоверных наблюдений: 1 287, из них – без цензуры: 1 208 (93,86 %) цензура: 79 (6,14 %) | $Z = 3,926186$ $p = 0,00009$ |
| Возрастная группа пациентов с ПКРЛ и АКЛ: до 50 лет | Общее количество: наблюдений 262; достоверных наблюдений: 261, из них – без цензуры: 253 (96,93 %) цензура: 8 (3,07 %) | $Z = 3,205829$ $p = 0,00135$ |
| Возрастная группа пациентов с ПКРЛ и АКЛ: от 51 до 60 лет | Общее количество: наблюдений 1 134; достоверных наблюдений: 1 131 из них – без цензуры: 1 090 (96,37 %) цензура: 41 (3,63 %) | <i>недостаточно:</i> $Z = 0,4230396$ $p = 0,67227$ |
| Возрастная группа пациентов с ПКРЛ и АКЛ: от 61 до 75 лет | Общее количество: наблюдений 1 956; достоверных наблюдений: 1 447, из них – без цензуры: 1 372 (94,82 %) цензура: 75 (5,18 %) | $Z = -12,0614$ $p = 0,000001$ |
| Возрастная группа пациентов с ПКРЛ и АКЛ: старше 75 лет | Общее количество: наблюдений 607; достоверных наблюдений: 607 из них: без цензуры: 545 (90,45 %) цензура: 62 (9,55 %) | $Z = -6,66636$ $p = 0,000001$ |

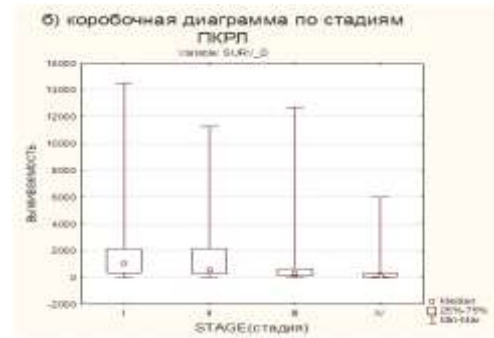
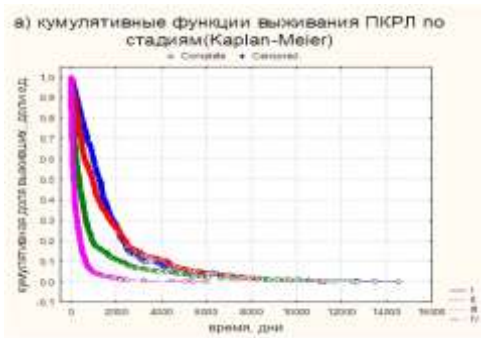
Анализ выживаемости в зависимости от стадии РЛ

При анализе исследуемой группы для обоих гистотипов было отмечено, что на IV стадии заболевания выявлено 68 % пациентов. Процентное соотношение выявления заболевания в зависимости от стадии для разных гистотипов различалось (Таблица 14). Первая стадия диагностирована в 14,25 % случаев для ПКРЛ и в 21,06 % случаев для АКЛ от исследуемой выборки пациентов, из них 5–7 % – это обследуемые от 51 до 60 лет. Вторая стадия заболевания диагностирована в 19,8 % случаев для АКЛ и в 25,0 % случаев для ПКРЛ. Третья и четвертая стадия 30,83 % – 27,20 % для ПКРЛ, и 18,63 % – 38,35 % для АКЛ, соответственно.

Таблица 14 – Распределение немелкоклеточного рака легкого по стадиям в зависимости от гистотипа

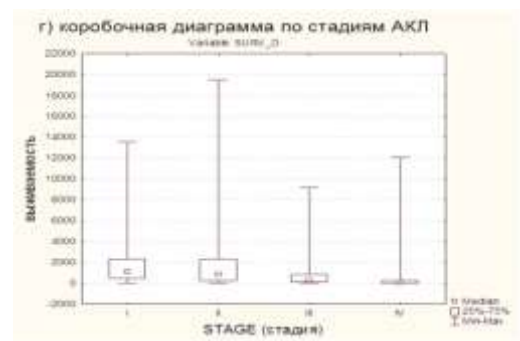
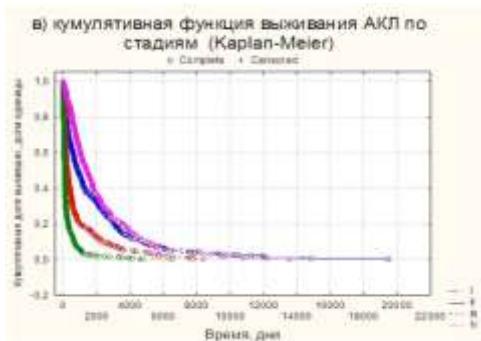
| Гистотип | Стадии (%) | | | |
|----------|-------------|------|-------|-------|
| | I | II | III | IV |
| ПКРЛ | 14,25 | 25,0 | 30,83 | 27,20 |
| АКЛ | 21,06 | 19,8 | 18,63 | 38,35 |

Отдельный анализ данных ПКРЛ и АКЛ, категорированных по стадиям болезни, достоверно подразделяет каждую выборку среднеранжированными показателями выживаемости на четыре подгруппы. Графики функции выживания в зависимости от стадии заболевания закономерно меняют степень вогнутости, и величину размаха от первой к четвертой стадии для обоих вариантов рака легкого, коробочные диаграммы наглядно демонстрируют различие в структуре подгрупп по стадиям ПКРЛ и АКЛ (Рисунок 21 а, б, в и г).



Примечание: переменная – количество дней, вычисленное на основе цензурируемых наблюдений, группирующая переменная – стадия; количество достоверных наблюдений – 2 924; без цензуры – 2 923 (99,97 %); подвергнуто цензуре – 1 (0,03 %). Тестовая статистика $\chi^2 = 876,7832$, $df = 3$, $p = 0,000001$.

Примечание: переменная – выживаемость, группирующая переменная – стадия.



Примечание: переменная – количество дней, вычисленное на основе цензурируемых наблюдений; группирующая переменная – стадия; количество достоверных наблюдений – 3 004; без цензуры – 2 780 (92,54 %); подвергнуто цензуре – 224 (7,46 %); тестовая статистика $\chi^2 = 1 039,120$, $df = 3$, $p = 0,000001$.

Примечание: переменная – выживаемость, группирующая переменная – стадия.

Рисунок 21 – Графики выживаемости в зависимости от стадии при разных гистотипах: а) – различия в графиках функции выживаемости при плоскоклеточном раке легкого в зависимости от стадии, вычисленные по данным выборки 2015–2019 гг. ($n = 3 007$); б) – различие структуры выборки выживаемости пациентов на коробочной диаграмме плоскоклеточного рака

легкого по стадиям заболевания по данным 2015–2019 гг. ($n = 3\ 007$);
 в) – различия в графиках функции выживаемости при аденокарциноме легкого в зависимости от стадии вычисленных по данным выборки 2015–2019 гг. ($n = 3\ 049$); г) – различие структуры выборки выживаемости пациентов на коробочной диаграмме АКЛ по стадиям заболевания по данным 2015–2019 гг. ($n = 3\ 049$)

Медиана выживаемости в подгруппах от первой к четвертой стадии имеет достоверные различия и для ПКРЛ, и для АКЛ и меняет свои значения в 3,5 раза. Наблюдается закономерное уменьшение медианы выживаемости от первой к четвертой стадии: от 2,8–3,0 лет на первой до 6,8–10,0 месяцев на четвертой. Тестовые статистики (критерий Хи-квадрат с процедурой Менделя) подтверждают достоверно значимое различие в выживаемости пациентов в зависимости от стадии заболевания (Таблица 15).

Таблица 15 – Медиана выживаемости пациентов при плоскоклеточном раке легкого и аденокарциноме легкого, категоризованных по стадиям болезни за период 2015–2019 гг.

| Для пациентов ПКРЛ (проверка критерием Хи-квадрат с процедурой Менделя = 341,6894; df = 4; p = 0,000001) | |
|---|----------------------------------|
| Стадии заболевания | 25 %; 50 % (медиана); 75 % (дни) |
| I | 627,7; 1 297,3; 2143,5 |
| II | 365; 956,6; 2 151,0 |
| III | 14,00; 368,547; 850,7 |
| IV | 42,3; 130; 368,5 |
| Для пациентов АКЛ (проверка критерием Хи-квадрат с процедурой Менделя = 40,13330; df = 4; p = 0,000001) | |
| Стадии заболевания | 25 %; 50 % (медиана); 75 % (дни) |
| I | 813,7; 1 423; 2 106,4 |
| II | 409,3; 1 086,3; 2 341,9 |
| III | 139; 456; 1 314,5 |
| IV | 33; 106; 425,3 |

Исходя из результатов нашего исследования, можно подтвердить, что стадия заболевания и при ПКРЛ и при АКЛ определенно влияет на медиану выживаемости с доверительной вероятностью 99,999 %.

Анализ выживаемости в зависимости от возраста

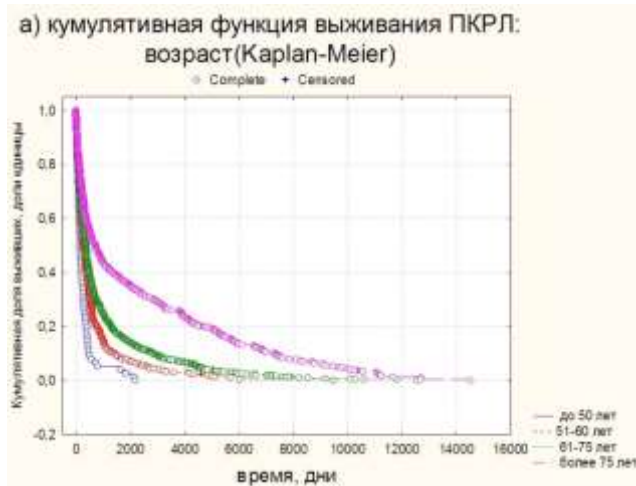
В нашем анализе выявлено, что основная доля НМРЛ в структуре заболевших в Новосибирской области, это пациенты в возрасте старше 50 лет (97 % для ПКРЛ и 95 % для АКЛ). Выделение влияния фактора возраста на прогноз (по медиане выживаемости) для пациентов с ПКРЛ и АКЛ также достоверно выявило четыре группы пациентов (Рисунок 22 а, б; Таблица 16).

Таблица 16 – Медиана выживаемости пациентов с плоскоклеточным раком легкого и с аденокарциномой легкого, категоризованных по возрастным группам за период 2015–2019 гг.

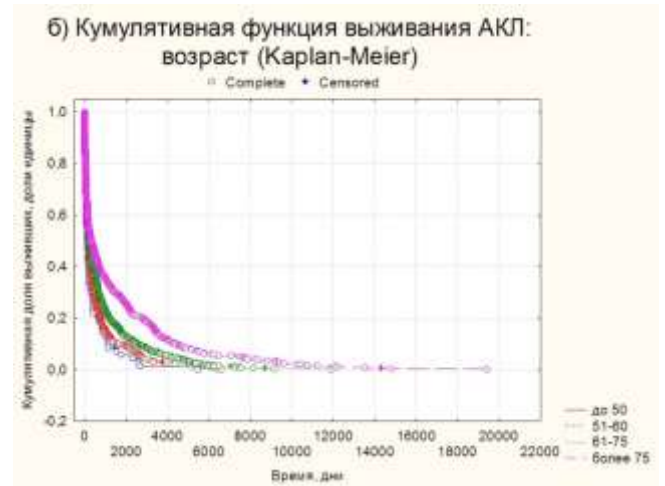
| Для пациентов со ПКРЛ (проверка критерием критерием Хи-квадрат с процедурой Ментеля = 341,6894; df = 4; p = 0,000001) | |
|--|---------------------------|
| Возрастные группы | Медиана выживаемости, дни |
| до 50 лет | 197,25 |
| 51–60 лет | 344,00 |
| 61–75 лет | 928,00 |
| более 75 лет | 1614,50 |
| Для пациентов с АКЛ (проверка критерием Хи-квадрат с процедурой Ментеля = 23,93492; df = 3; p = 0,00003) | |
| Возрастные группы | Медиана выживаемости, дни |
| до 50 лет | 142,00 |
| 51–60 лет | 391,00 |
| 61–75 лет | 539,00 |
| более 75 лет | 414,00 |

Проверочные критерии это подтвердили с высокой вероятностью (более 99,99 %). Анализ возрастной категории людей, имеющих ПКРЛ или АКЛ, показал преобладание группы пациентов старше 60 лет (78 %), средний возраст

для ПКРЛ и АКЛ оказался примерно одинаков 67,5 и 67,8 лет. Основная доля (25–75 перцентили) укладывается в диапазон 60,80–72,07 года для ПКРЛ и 61,11–74,47 года для АКЛ (см. таблицу 16).



Примечание: переменная – количество дней, вычисленное на основе цензурируемых наблюдений; группирующая переменная – возраст; количество достоверных наблюдений – 3 006; без цензуры – 2 923 (99,97 %); подвергнуто цензуре – 83 (2,76 %); тестовая статистика $\chi^2 = 86,67243$, $df = 3$, $p = 0,000001$.



Примечание: переменная – количество дней, вычисленное на основе цензурируемых наблюдений; группирующая переменная – стадия; количество достоверных наблюдений – 3 004; без цензуры – 2 780 (92,54 %); подвергнуто цензуре – 224 (7,46 %); тестовая статистика $\chi^2 = 24,15292$, $df = 3$, $p = 0,00002$.

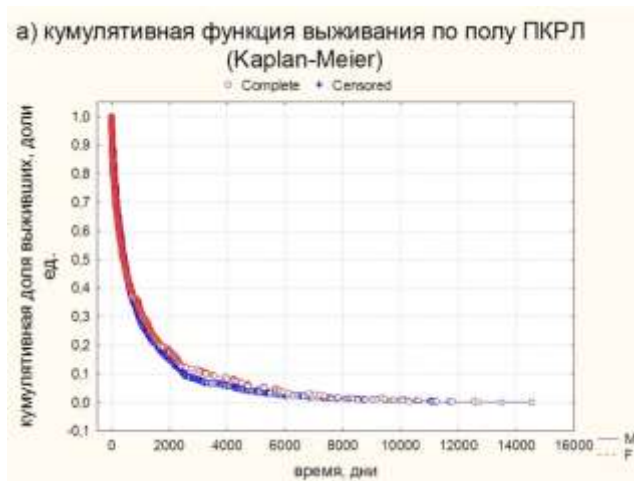
Рисунок 22 – Графики выживаемости в зависимости от возраста при разных гистотипах: а) – различия графиков функции выживаемости при плоскоклеточном раке легкого в зависимости от возраста вычисленных по данным выборки 2015–2019 гг. ($n = 3\ 007$); б) – различия графиков функции выживаемости при аденокарциноме легкого в зависимости от возраста, вычисленных по данным выборки 2015–2019 гг. ($n = 3\ 049$)

Отмечено, что в структуре выживаемости медиана также растет с возрастом пациентов, для людей до 50 лет она заметно снижена и имеет минимальные значения (в среднем 5 месяцев для ПКРЛ и АКЛ). Обнаружено, что для пациентов возрастной группы 61 год и старше, находящихся на I и II стадии заболевания,

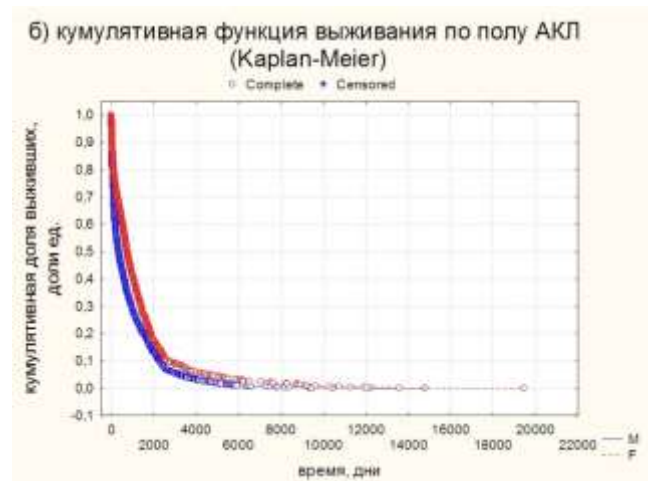
характерны максимальные значения выживаемости, порядка 10–15 лет. У лиц 30–40-летнего возраста к пациентам старше 60 лет, показатель выживаемости изменяется до 6,44 раза для ПКРЛ и 3,35 раза для больных АКЛ, в среднем медиана колеблется от полугода до четырех лет для ПКРЛ, и от полугода до полутора лет для АКЛ (см. рисунок 22 а, б).

Анализ выживаемости в зависимости от пола

При изучении влияния пола на структуру выживаемости для ПКРЛ и АКЛ обнаружилось, что доля женщин в общей структуре значительно меньше доли мужчин. Так при ПКРЛ мужчины представлены 87,81 %, женщины – 9,21 %; при АКЛ характерна более высокая доля женщин – 30,34 %, но также преобладают мужчины – 69,65 %. Характерно, что фактор принадлежности к женскому или мужскому полу в случае с ПКРЛ никак не влияет на медиану выживаемости пациентов с данным гистотипом, не смотря на то, что женщин, болеющих ПКРЛ, в 2,3 раза меньше, чем мужчин. Мужчины и женщины принадлежат к одной выборочной совокупности, медианы выживаемости (для мужчин 445 дней, для женщин 414 дня) близки по значениям, квартильный интервал, асимметрия и эксцесс оказались примерно равные. Проверка проведена с помощью логрангового критерия и критерием Хи-квадрат с процедурой Ментеля, контрольная статистика равна 0,0087217 при уровне значимости 0,9256. Таким образом, различие в выживаемости в зависимости от фактора половой принадлежности пациентов при диагнозе ПКРЛ не подтвердилось (Рисунок 23 а).



Примечание: переменная – количество дней, вычисленное на основе цензурируемых наблюдений; группирующая переменная – возраст; количество достоверных наблюдений – 3 006; без цензуры – 2 923 (99,97 %); подвергнуто цензуре – 83 (2,76 %); тестовая статистика $Z = 0,0098290$, $p = 0,99216$; влияние фактора «Пол» не достоверно.



Примечание: переменная – количество дней, вычисленное на основе цензурируемых наблюдений; группирующая переменная – стадия; количество достоверных наблюдений – 3 004; без цензуры – 2 780 (92,54 %); подвергнуто цензуре – 224 (7,46 %); тестовая статистика $Z = 7,57835$, $p = 0,00000$.

Рисунок 23 – Графики выживаемости в зависимости от пола при разных гистотипах: а) – слияние графиков функции выживаемости при плоскоклеточном раке легкого в зависимости от пола, вычисленных по данным выборки 2015–2019 г. ($n = 3\ 007$); б) – различия в графиках функции выживаемости при аденокарциноме легкого в зависимости от пола, вычисленных по данным выборки 2015–2019 гг. ($n = 3\ 049$)

При выборке пациентов с АКЛ обнаружено достоверное разделение на две категории: мужчины и женщины. Медиана выживаемости у женщин в 2,01 раза выше, чем таковая у мужчин (два года и один год соответственно), размах и верхние квартильные (75 %) значения показателя выживаемости также в 2,7 раза выше у пациенток с данным диагнозом. Достоверность влияния фактора половой принадлежности на выживаемость пациентов при АКЛ проверялась логарифмически ранговым и обобщенным критерием Уилкоксона – Гехана, с

вероятностью 99,99 %. Также показательно, что для АКЛ половая принадлежность пациента существенно влияла на медиану выживаемости (см. рисунок 23 б; Таблица 17).

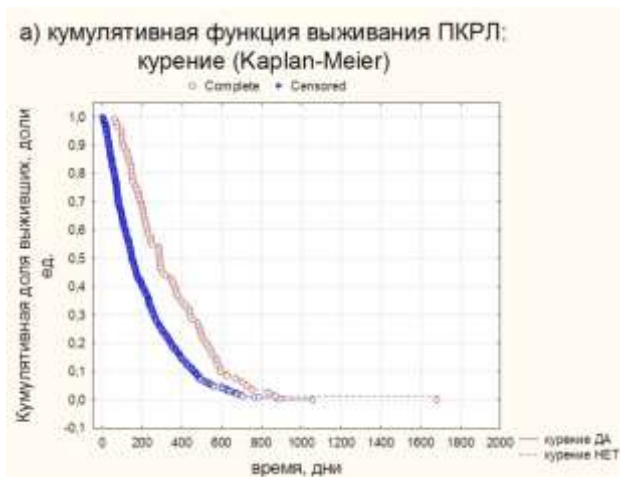
Таблица 17 – Медиана выживаемости пациентов при аденокарциноме легкого, сгруппированных по гендерной принадлежности за период 2015–2019 гг.

| 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 |

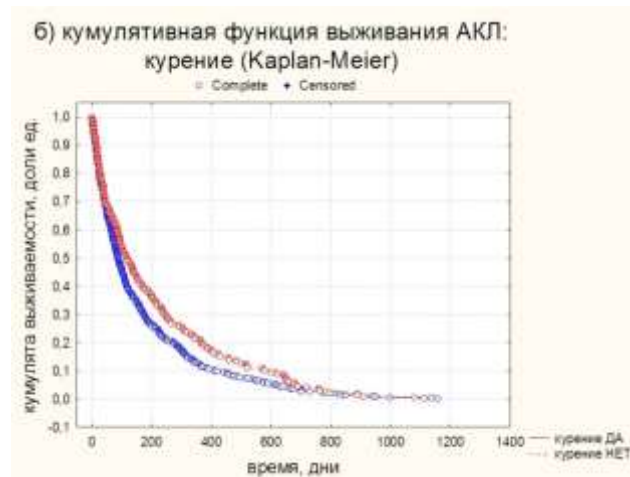
Более того было отмечено, что диагностика АКЛ на I–II стадии у женщин на 4 % выше, чем у мужчин на этой же стадии, тогда как для ПКРЛ такой тенденции выявлено не было.

Анализ выживаемости в зависимости от статуса курения

Исследование влияния курения на выживаемость проверялось с помощью логарифмически рангового критерия, критерия Уилкоксона, обобщенного Геханом, а также многовыборочным критерием Хи-квадрат для непараметрических данных с процедурой Ментеля. При разделении выборок по наличию данного фактора отмечено преобладание курильщиков среди пациентов НМРЛ, структура выборки пациентов это наглядно подтверждает, и выглядит следующим образом: для ПКРЛ число пациентов с ИК (индекс курения) более 10 пачка/лет – 87,89 %, число некуривших – 12,11 %; для АКЛ характерна бóльшая доля «никогда не куривших», число пациентов с ИК более 10 пачка/лет – 64,02 %, не куривших – 36,98 %. Анализ функции выживаемости обеих выборок показал, что курение достоверно снижает медиану выживаемости у пациентов с ПКРЛ в 1,92 раза, при АКЛ – в 1,32 раза. Различия в функциях выживаемости наглядно демонстрируют ухудшение прогноза для длительно курящих пациентов как для ПКРЛ, так и для АКЛ (Таблица 18, Рисунок 24).



Примечание: переменная – количество дней; переменная с индикатором цензуры – censored; группирующая переменная – курение; общее количество достоверных наблюдений – 648: без цензуры – 647 (99,85 %); с цензурой – 1 (0,15 %).



Примечание: переменная – количество дней; переменная с индикатором цензуры – censored; группирующая переменная – курение; общее количество достоверных наблюдений – 706: без цензуры – 705 (99,86 %), с цензурой: 1 (0,14 %).

Рисунок 24 – 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)

Тестовые статистики показывают различную вероятностную характеристику влияния фактора курения на медиану выживаемости при ПКРЛ и АКЛ, но в обоих случаях пороговое значение не ниже 99,989 % (Таблица 20).

Таблица 18 – Медиана выживаемости пациентов при плоскоклеточном раке легкого и при аденокарциноме легкого с наличием или отсутствием признака «курение» за период 2017–2019 гг.

| Для пациентов со ПКРЛ (Log-Rank Test WW = 112,07; Sum = 559,13; Var = 61,896. Test statistic = 14,24513; p = 0,000001) | |
|---|---------|
| Значение признака | Медиана |
| курение: да | 150,5 |
| курение: нет | 289,0 |
| Для пациентов с АКЛ (Log-Rank Test WW = 32,379; Sum = 693,89; Var = 160,33. Test statistic = 2,557125; p = 0,01055) | |
| Значение признака | Медиана |
| курение: да | 88 |
| курение: нет | 116 |

Что касается влияния курения на возраст заболевшего, то с высокой достоверной вероятностью у длительно курящих людей ПКРЛ возникает раньше в среднем на 4,03 года, и АКЛ – на 5,29 года (тестовая статистика критерий Хи-квадрат для непараметрических данных равна 25,6484; при уровне значимости менее 0,00001). Средний возраст курильщиков для ПКРЛ составил 64,61 года, а для никогда не куривших пациентов – 68,64 года, для АКЛ разница еще больше – 65,34 и 70,63 года соответственно. При анализе функции выживания отдельно у мужчин и отдельно у женщин по признаку «курение» оказалось, что кроме того, что длительное курение в целом ухудшает прогноз выживаемости при раке легкого; для мужчин характерно большее медианное значение выживаемости при ПКРЛ, чем при АКЛ – достоверное отличие медианы в 2,45 и 1,68 раза, т. е. прогноз при гистотипе ПКРЛ несколько благоприятнее для мужчин. Проверка проводилась непараметрическим многовыборочным критерием Хи-квадрат, тестовые статистики равны –6,74240 (ИК больше 10 пачка/лет) и –5,23382 (ИК = 0 пачка/лет) при уровне значимости менее 0,000001.

Для некурящих женщин такая тенденция сохраняется, медианные значения выживаемости ПКРЛ и АКЛ отличаются в 2,02 раза; проверка осуществлялась критерием Хи-квадрат с процедурой Ментеля для непараметрических данных, тестовая статистика равна $-2,07902$ при уровне значимости $-0,03762$. А для курящих женщин разница выживаемости между ПКРЛ и АКЛ нивелируется, что подтверждается статистически (тестовая статистика равна $-0,740422$ при уровне значимости $0,45904$). Таким образом, активное длительное курение у женщин достоверно ухудшает прогноз ПКРЛ.

3.2 Анализ соматических мутаций в гене *EGFR* у курящих и некурящих пациентов с аденокарциномой легкого

Проведен анализ 580 историй болезни пациентов с диагнозом «рак легкого», которые были прооперированы в условиях онкологического отделения № 3 Новосибирского областного клинического онкологического диспансера в период с 2013 по 2017 год. Данные об обследованных больных представлены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19 – Число пациентов (%) с различными морфологическими вариантами рака легкого в зависимости от курения

| Клинический показатель | Аденокарцинома | Плоскоклеточный рак | Крупноклеточный рак |
|------------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Мужчины | 352 (61 %) | 13 (2,2 %) | 4 (0,7 %) |
| Средний возраст | 61,13 | 56,7 | 61,5 |
| Курящие | 184 (52,3 %) | 8 (61,5 %) | 2 (50 %) |
| Некурящие | 153 (43,5 %) | 4 (31 %) | 2 (50 %) |
| Курящие ранее | 14 (4 %) | 1 (7,5 %) | 0 (0 %) |
| Неизвестно (курение) | 1 (0,2 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |
| Женщины | 197 (33,9 %) | 2 (0,3 %) | 3 (0,45 %) |
| Средний возраст | 61,6 | 50,0 | 56,0 |
| Курящие | 11 (5,6 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

Продолжение таблицы 19

| Клинический показатель | Аденокарцинома | Плоскоклеточный рак | Крупноклеточный рак |
|------------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Не курящие | 182 (92,4 %) | 1 (50 %) | 3 (100 %) |
| Курил ранее | 4 (2 %) | 1 (50 %) | 0 (0 %) |
| Неизвестно (курение) | 0 (0 %) | 0 (0 %) | 0 (0 %) |

Таблица 20 – 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 %) |

Так как определение мутаций в гене *EGFR* целесообразно главным образом для больных с АКЛ, большинство пациентов (572) в нашем исследовании представлены с этим морфологическим вариантом новообразования. В структуре таких пациентов преобладают мужчины – 352 человек, что составляет 61 % от общего числа пациентов с АКЛ. Средний возраст мужчин с АКЛ составил $61,13 \pm 0,42$. Курящие мужчины, у которых подтвердился диагноз АКЛ легкого, составили 184 человека, это 52,3 % от общего числа мужчин с данным типом опухоли. Некурящие мужчины составили 153 человека – 43,5 %. Мужчины, которые курили ранее, составили 14 человек – 4 %, неизвестен анамнез курения у 1 пациента – 0,2 %. Выявление мутации в гене *EGFR* в группе больных с АКЛ показало, что у 9 курящих пациентов обнаружена мутация *EGFR*, что составляет

2,6 % от общего числа мужчин с АКЛ. В группе с АКЛ у некурящих мужчин количество пациентов с мутаций в гене *EGFR* составило 21 (6 %). В образцах плоскоклеточного рака у мужчин данные о наличии мутации *EGFR* не подтвердились.

У женщин выявлено 197 случаев АКЛ, что составляет 33,9 % от общего числа больных с АКЛ. Средний возраст женщин составил ($61,6 \pm 0,63$) лет. Женщин с курением в анамнезе с АКЛ было 11 человек, что составило только 5,6 % от общего количества пациентов с АКЛ. При этом 182 пациентки (92,4 %) не курили, а 4 пациентки (2 %) курили ранее. Мутации в гене *EGFR* не присутствовали у курящих женщин. У некурящих – мутация выявлена в 70 случаях, что составляет 35,5 %. Средний возраст у некурящих пациенток с АКЛ, несущих мутацию в гене *EGFR*, равен $61,1 \pm 1,14$. У женщин, которые курили ранее, в двух случаях выявлена мутация в гене *EGFR*. В двух случаях плоскоклеточного рака у женщин *EGFR* мутации выявлено не было.

3.3 Возможности «жидкой» биопсии в оценке резистентности к тирозинкиназным ингибиторам при *EGFR* мутированном немелкоклеточном раке легкого

Был применен принцип интервального забора плазмы для оценки титра первичной мутации в гене *EGFR* в циркулирующей ДНК, позволяющий выявить рецидив за 2–12 месяцев до появления клинических проявлений прогрессирования РЛ [180].

С целью контроля плазма крови была забрана у 12 добровольцев (6 мужчин и 6 женщин). Исследовательская группа состояла из 20 пациентов, у которых были забраны парные образцы плазмы крови до операции и парафиновые блоки с опухолевой тканью после выполненной радикальной операции, у пациентов с НМРЛ, а также образцы плазмы крови были забраны у 16 пациентов с НМРЛ с подтвержденной мутацией в гене *EGFR*, которые получали лечение ИТК (Таблица 21).

Таблица 21 –Характеристика пациентов, включенных в исследование (НД – нет данных)

| Порядковый номер | Номер пациента | Пол | Возраст | Гистологический тип опухоли |
|---|----------------|-----|---------|-----------------------------|
| Случаи с мутантным <i>EGFR</i> в ДНК опухолевой ткани парафинового блока и плазмы крови до операции | | | | |
| 1 | ВК7 | Ж | 53 | НМРЛ, без уточнения |
| 2 | ВК16 | Ж | 68 | НМРЛ, без уточнения |
| 3 | ВК35 | Ж | 54 | АКЛ |
| 4 | ВК40 | Ж | 74 | АКЛ |
| 5 | ВК54 | М | 60 | АКЛ |
| 6 | ВК59 | М | 59 | АКЛ |
| 7 | ВК74 | Ж | 62 | АКЛ |
| Случаи без мутации <i>EGFR</i> в ДНК опухолевой ткани парафинового блока и плазмы крови до операции | | | | |
| 8 | ВК1 | М | 53 | НМРЛ, без уточнения |
| 9 | ВК3 | М | 47 | АКЛ |
| 10 | ВК8 | Ж | 59 | НМРЛ, без уточнения |
| 11 | ВК9 | Ж | 63 | АКЛ |
| 12 | ВК10 | М | 63 | НМРЛ, без уточнения |
| 13 | ВК17 | М | 60 | АКЛ |
| 14 | ВК20 | М | 54 | ПКРЛ |
| 15 | ВК23 | М | 64 | ПКРЛ |
| 16 | ВК24 | М | 43 | ПКРЛ |
| 17 | ВК25 | М | 73 | АКЛ |
| 18 | ВК29 | М | 64 | АКЛ |
| 19 | ВК53 | М | 68 | ПКРЛ |
| 20 | ВК60 | М | 56 | ПКРЛ |
| Случаи с мутантным <i>EGFR</i> с терапией ингибиторами тирозинкиназы | | | | |
| 21 | ВК57 | Ж | 53 | АКЛ |
| 22 | ТМВ1 | Ж | 60 | АКЛ |
| 23 | ХАН2 | М | 80 | НМРЛ, без уточнения |

Продолжение таблицы 20

| Порядковый номер | Номер пациента | Пол | Возраст | Гистологический тип опухоли |
|------------------|----------------|-----|---------|-----------------------------|
| 24 | MAT3 | Ж | 70 | НМРЛ, без уточнения |
| 25 | GLF4 | Ж | 73 | АКЛ |
| 26 | SLF5 | Ж | 62 | АКЛ |
| 27 | KVI6 | М | НД | НМРЛ, без уточнения |
| 28 | CAB7 | Ж | 64 | АКЛ |
| 29 | PIM8 | Ж | 52 | АКЛ |
| 30 | DVI9 | М | 60 | АКЛ |
| 31 | IEV10 | Ж | 69 | АКЛ |
| 32 | BVI11 | М | 60 | АКЛ |
| 33 | FVY12 | М | 67 | АКЛ |
| 34 | G013 | М | НД | АКЛ |
| 35 | KMG14 | Ж | 77 | АКЛ |
| 36 | B16 | Ж | НД | НМРЛ, без уточнения |

Значение dCt было значительно выше для циркулирующей ДНК дикого типа по сравнению с позитивным контролем, что указывает на то, что метод дифференцировал ДНК с 1 % мутантных аллелей *EGFR* (L858R, E746_A750delELREA, L861Q, S768I) или 5 % мутантных аллелей *EGFR* (G719S, T790M) от дикого типа циркулирующей ДНК с $p > 0,95$ (Рисунок 25).

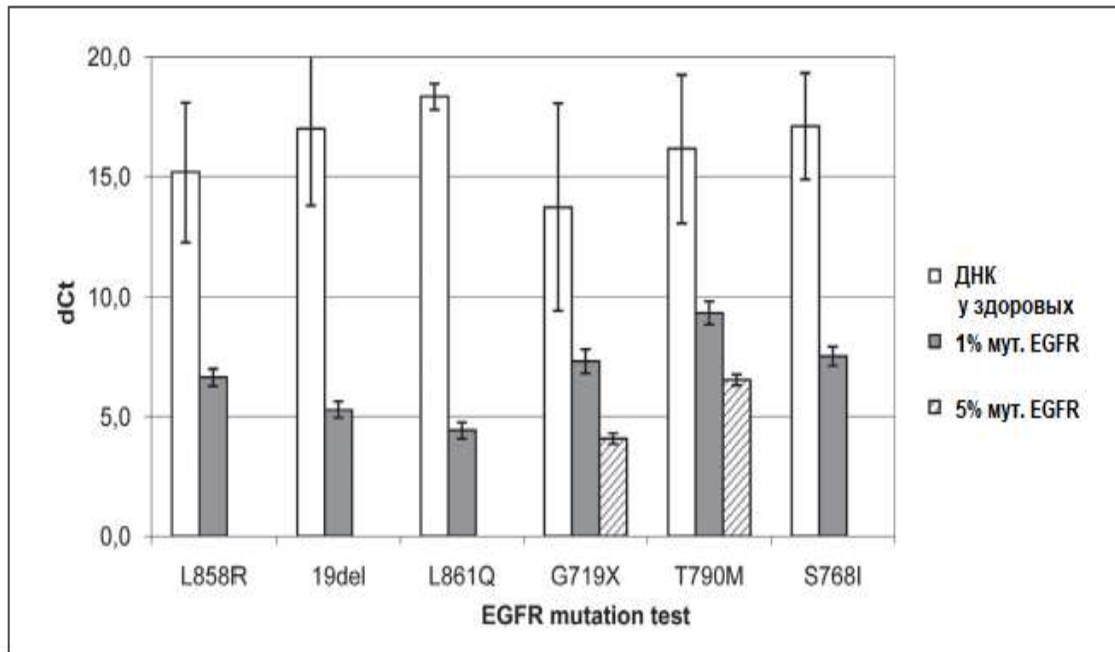


Рисунок 25 – Чувствительность и специфичность полимеразной цепной реакции в реальном времени для мутаций *EGFR*. Мутации *EGFR* L858R, L861Q, g719X, t790M, s768I и делеции в *EGFR* экзон 19 (19del) были определены с помощью набора «Real-pcR-EgFR-7Rp» (Biolink, Россия)

Чувствительность «жидкой» биопсии оценивали, сопоставляя полученные данные мутационного статуса из парафиновых блоков операционного материала и плазмы крови, которую брали за 1 неделю до операции (Таблица 22).

Таблица 22 – Сопоставление мутаций *EGFR* в парафиновых блоках и плазме крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (ДТ – дикий тип)

| Номер пациента | ДНК парафиновые блоки | ДНК плазмы |
|---|-----------------------|------------|
| Случаи с наличием <i>EGFR</i> мутации в ДНК из парафиновых блоков | | |
| ВК7 | G719X; S768I | S768I |
| ВК16 | 19del | 19del |
| ВК35 | 19del | 19del; |
| ВК40 | L861Q | ДТ |
| ВК54 | L858R | ДТ |

Продолжение таблицы 22

| Номер пациента | ДНК парафиновые блоки | ДНК плазмы |
|---|-----------------------|------------|
| Случаи с наличием <i>EGFR</i> мутации в ДНК из парафиновых блоков | | |
| ВК59 | L858R | L858R; |
| ВК74 | 19del | ДТ |
| Случаи без мутаций <i>EGFR</i> в ДНК из парафиновых блоков | | |
| ВК1 | ДТ | ДТ |
| ВК3 | ДТ | ДТ |
| ВК8 | ДТ | ДТ |
| ВК9 | ДТ | ДТ |
| ВК10 | ДТ | ДТ |
| ВК17 | ДТ | ДТ |
| ВК20 | ДТ | ДТ |
| ВК23 | ДТ | ДТ |
| ВК24 | ДТ | ДТ |
| ВК25 | ДТ | ДТ |
| ВК29 | ДТ | ДТ |
| ВК53 | ДТ | ДТ |
| ВК60 | ДТ | ДТ |

Как видно из таблицы 22, из 7 случаев с выявленной мутации *EGFR* в парафиновых блоках только в 3 случаях обнаружены те же мутации в гене *EGFR* циркулирующей ДНК плазмы. Интересно отметить, что у пациента с номером ВК7 в парафиновых блоках выявлено два вида мутации в гене *EGFR* (G719X; S768I), а в плазме – только S768I.

Крайне важно отметить, что в 13 случаях отсутствие мутаций *EGFR* в парафиновых блоках соответствовали такому же результату и в ДНК циркулирующей плазме. Эти результаты показывают, что используемый метод имеет чувствительность 57 % (4 / 7) и 100 % специфичность (13 / 13).

Изменение частоты мутантного аллеля в гене *EGFR* в плазме крови у пациентов, получающих лечение ИТК может служить маркером чувствительности к проводимой терапии или развития резистентности к лечению. Поэтому в нашей

работе мы интервально оценивали мутацию в *EGFR* в циркулирующей ДНК плазмы крови у 16 пациентов, которые получали лечение ИТК (гефитиниб или эрлотиниб). Из 16 пациентов с НМРЛ, находящихся на мониторинге, у 12 была выявлена мутация Del 19, и у 4 пациентов – мутация L858R. В 8 случаях из 16 соответствующие мутации были подтверждены и в плазме крови. Из 8 случаев наличия мутации в плазме в 7 вариантах были такие же мутации, какие определенные в блоке, а в одном случае в плазме выявлена одна мутация как в блоке (L858R) и дополнительная мутация T790M, которая изначально не определялась в парафиновом блоке (Таблица 23).

Таблица 23 – Характеристика мутаций в гене *EGFR* в циркулирующей ДНК плазмы пациентов, получающих лечение ингибиторами тирозинкиназы

| Номер пациента | Вид лечения | EGFR мутации | |
|--|--------------------|------------------|--------------------------|
| | | Парафиновый блок | Циркулирующая ДНК плазмы |
| BK57 | S, TKI | L858R | L858R |
| TMB1 | TKI | L858R | L858R, T790M |
| ХАН2 | ChT, TKI | 19del | ДТ |
| MAT3 | S, TKI | 19del | ДТ |
| GLF4 | TKI | 19del | ДТ |
| SLF5 | S, ChT, TKI | 19del | ДТ |
| KVI6 | TKI | 19del | ДТ |
| CAB7 | TKI | 19del | ДТ |
| PIM8 | TKI, RT | 19del | 19del |
| DVI9 | TKI, G | 19del | 19del |
| IEV10 | S, TKI | 19del | 19del |
| BVI11 | S, TKI | 19del | ДТ |
| FVY12 | S, RT, ChT, TKI | 19del | ДТ |
| G013 | TKI | L858R | L858R |
| KMG14 | S, ChT, TKI | 19del | 19del |
| B16 | TKI | L858R | L858R |
| Примечание: ChT – полихимиотерапия, G – гамма-нож, RT – лучевая терапия, S – хирургическое лечение, TKI – лечение гефитинибом или эрлотинибом; ДТ – дикий тип. | | | |

Для наглядности в нашей работе, на примере четырех наиболее интересных случаев, мы показали изменение частоты мутационного аллеля в *EGFR* циркулирующей ДНК плазмы пациентов, которые получали лечение ИТК (Рисунки 25, 26, 27 и 28).

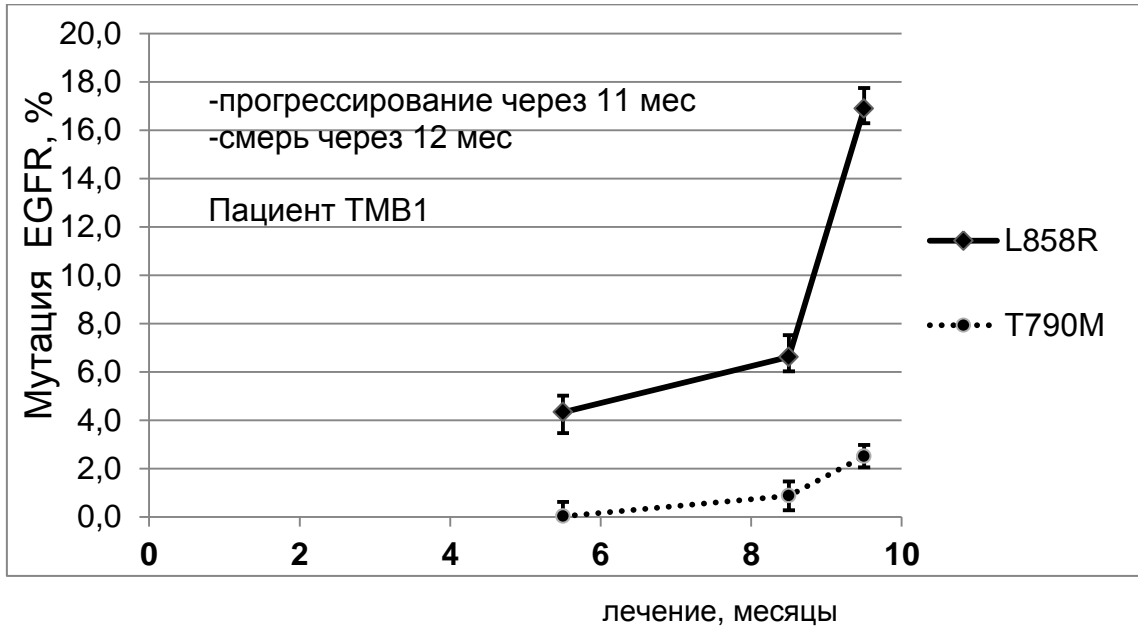


Рисунок 26 – Частоты мутационного аллеля в *EGFR* циркулирующей ДНК плазмы пациента ТМВ1, получающего ингибиторы тирозинкиназы

На рисунке 26 видно, что для пациента с номером ТМВ1 мутации в гене *EGFR* (L858R и T790M) были определены через 5,5 и 8,5 месяца с момента начала лечения ИТК. Тогда как клинические проявления прогрессирования РЛ были выявлены лишь через 11 месяцев от начала терапии.

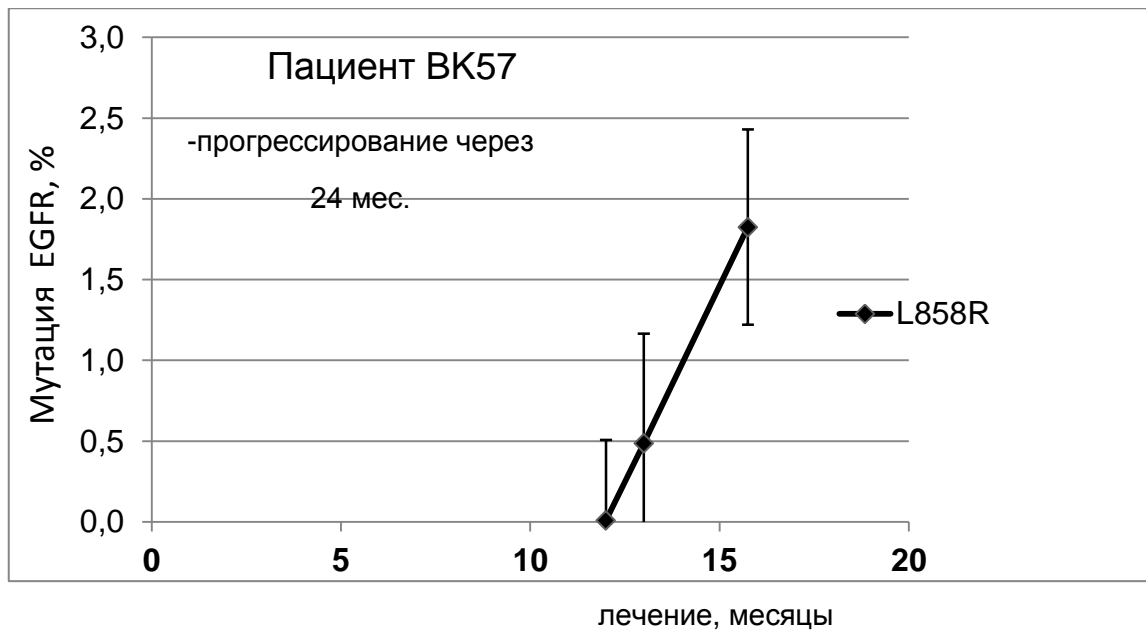


Рисунок 27 – Частоты мутационного аллеля в *EGFR* циркулирующей ДНК плазмы пациента BK57, получающего ингибиторы тирозинкиназы

У пациента BK57 увеличение мутации L858R определялось в циркулирующей ДНК плазме через 12 месяцев от начала лечения эрлотинибом, а прогрессирование в виде появления метастазов в кости было выявлено через 24 месяца от начала лечения (см. рисунок 27).

У пациента DV19 в опухоли и в циркулирующей ДНК плазмы была определена мутация Del 19. После 1 месяца лечения гефитинибом мутация в циркулирующей ДНК плазмы не определялась. Позже у пациента возникло прогрессирование РЛ за счет появления метастазов в головном мозге, но это не привело к появлению мутации в циркулирующей ДНК плазмы (Рисунок 28).

У пациента G013 уровень мутации L858R в циркулирующей ДНК плазмы постепенно снижался на фоне терапии гефитинибом, и к 3-му месяцу лечения мутация перестала определяться в плазме. Начиная с 5-го месяца от начала лечения ИТК, мутация вновь определилась в плазме, и ее уровень продолжал расти до 6-го месяца. Не смотря на это, клинические проявления прогрессирования болезни были выявлены через 8,5 месяца от начала лечения (Рисунок 29).

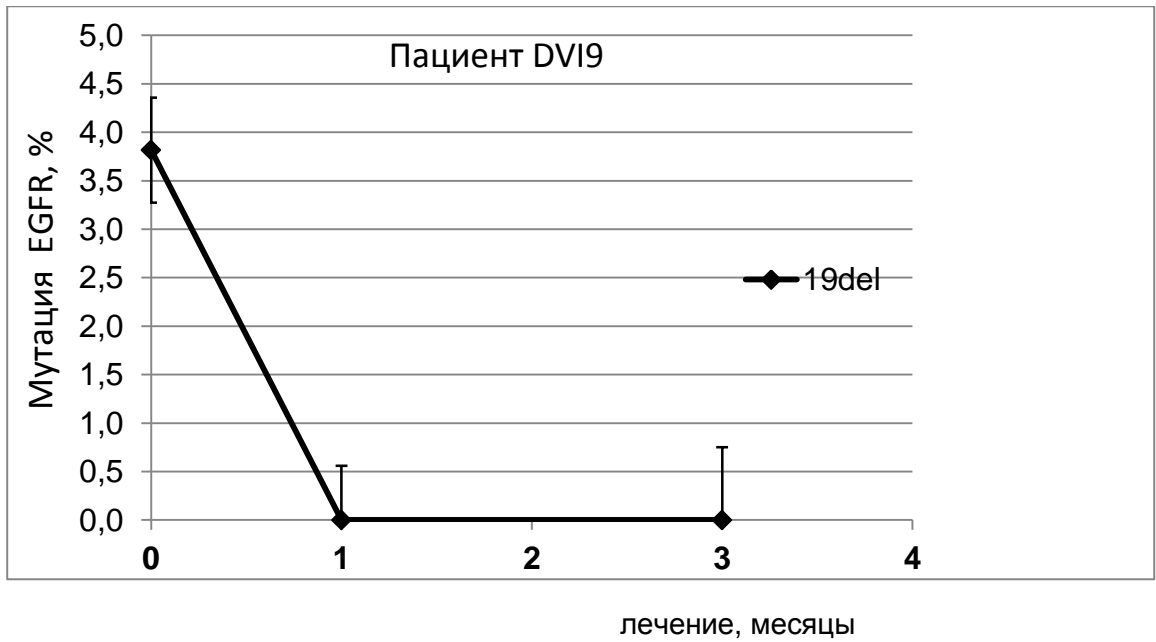


Рисунок 27 – Частоты мутационного аллеля в *EGFR* циркулирующей ДНК плазмы пациента DV19, получающего ингибиторы тирозинкиназы

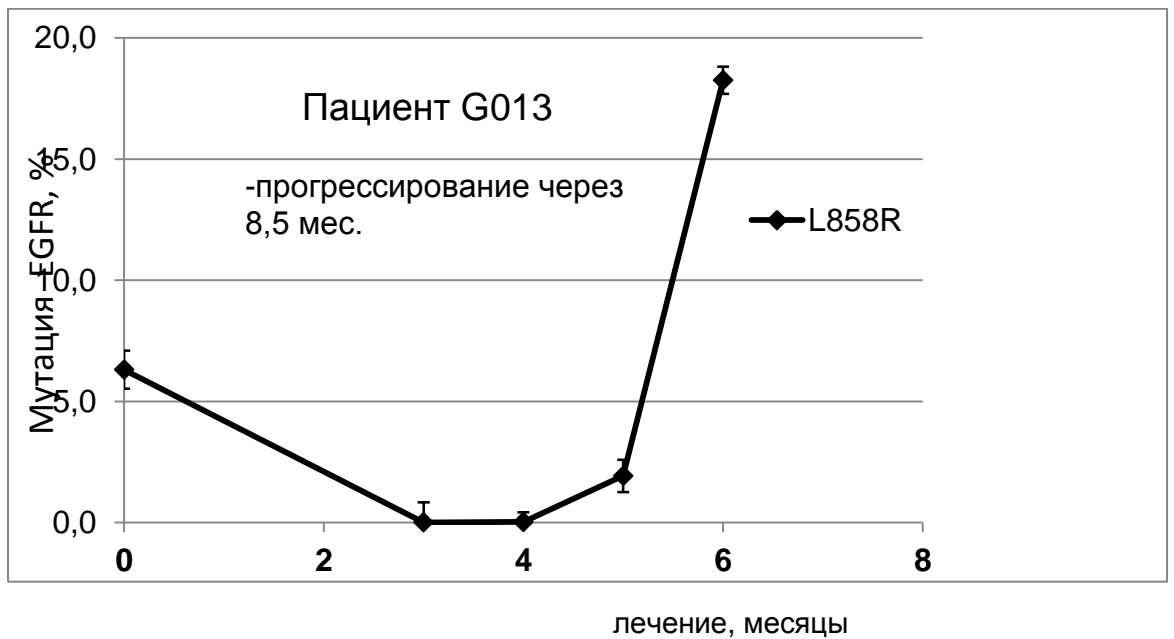


Рисунок 29 – Частоты мутационного аллеля в *EGFR* циркулирующей ДНК плазмы пациента G013, получающего ингибиторы тирозинкиназы

Таким образом, во всех представленных случаях нами было показано, что уровень мутации в циркулирующей ДНК плазмы повышался по времени раньше, чем появлялись клинические проявления прогрессирования РЛ.

В рамках этого раздела нашей работы приводятся два клинических случая практического применения подхода использования возможности «жидкой» биопсии.

Клинический случай № 1

Пациент Г., 62 года, в марте 2017 года был установлен диагноз: центральный рак нижней доли левого легкого T2N0M0 (аденокарцинома).

В связи с установленным клиническим диагнозом и стадией заболевания на первом этапе лечения выполнена операция 16.03.2017 г. в объеме: левосторонняя торакотомия, ревизия. В ходе операции выявлен канцероматоз левой плевральной полости, что было подтверждено гистологическим исследованием. С учетом интраоперационной находки радикальная операция была не показана. Окончательное гистологическое заключение – аденокарцинома. При молекулярно-генетическом анализе опухолевого материала выявлена мутация в 21 экзоне гена *EGFR* – L858R.

С 28.03.2017 г. начата терапия афатинибом в дозе 40 мг 1 раз в сутки. Через 1 месяц лечения выполнена компьютерная томография (КТ) органов грудной клетки, по данным которой отмечался частичный ответ, в связи с чем лечение было продолжено. Очные явки с клиническим осмотром выполнялись ежемесячно, КТ органов грудной клетки выполнялась 1 раз в 3 месяца.

При проведении КТ органов грудной клетки и органов брюшной полости с внутривенным контрастным усилением 10.05.2018 г. выявлен продолженный рост первичной опухоли более чем на 25 %, что является критерием прогрессирования заболевания по шкале RECIST 1.1. Длительность таргетной терапии составила 14 месяцев. С учетом выявленного прогрессирования заболевания пациент переведен на полихимиотерапию (ПХТ) по схеме Пеметрексед 500 мг/м² в 1-й день, Цисплатин 75 мг/м² в первый день, Бевацизумаб 7,5 мг/кг в 1-й день внутривенно каждые 3 недели, лечение было начато 20.05.2018 г.

После 3 курсов лечения представленной схемой ПХТ, при контрольном обследовании 01.08.2018 г. вновь выявлено прогрессирование заболевания за счет появления новых метастатических очагов в легком и правом надпочечнике, что

послужило поводом переключить пациента на 3-ю линию монокимиотерпии в режиме Доцетаксел 75 мг/м² в 1-й день каждые 3 недели. Представленной схемой проведено 6 курсов лечения с частичным ответом и последующей стабилизацией заболевания (по шкале RECIST 1.1). После окончания химиотерапии пациент оставлен под динамическим наблюдением.

Контрольная КТ органов грудной клетки и органов брюшной полости с внутривенным контрастным усилением выполнена 17.12.2018 г., при этом выявлено прогрессирование заболевания за счет продолженного роста метастатических очагов в легких.

С учетом использованных трех линий лечения и отсутствия технической возможности выполнения тканевой ребиопсии принято решение провести молекулярно-генетический анализ плазмы крови и мочи («жидкостная» биопсия) на наличие мутации резистентности T790M в гене EGFR. ДНК выделяли из 4 мл плазмы пациента с помощью QI Aamp Circulating Nucleic Acid Kit. Анализ активирующих соматических мутаций в гене *EGFR* выполняли методом цифровой капельной ПЦР на приборе QX100 (Bio-Rad). В результате мутация резистентности к ИТК T790M не выявлена, но был получен высокий уровень (более 10 %) первичной мутации L858R в плазме пациента (Рисунок 30).

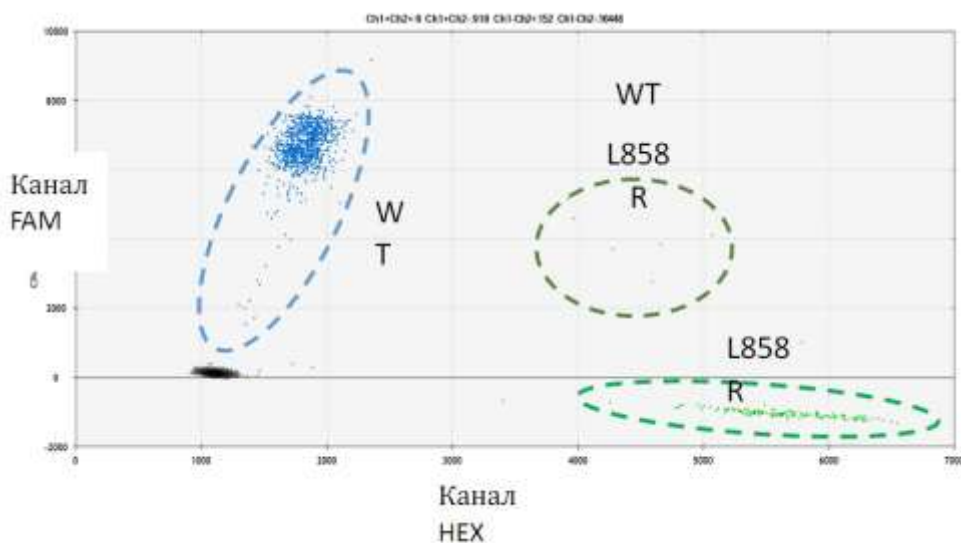


Рисунок 30 – Выявление мутации L858R в ДНК из плазмы

В тоже время, обращал на себя внимание, что первичная мутация L858R выявлялась и в моче пациента (10 мл на анализ), но в значительно меньшем количестве (Рисунок 31).

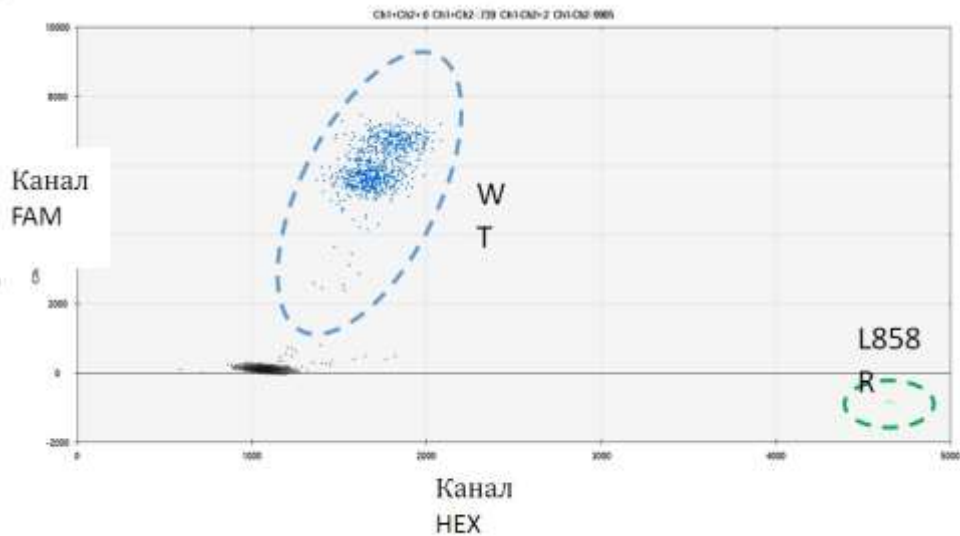


Рисунок 31 – Выявление мутации L858R в ДНК из мочи

Полученные результаты послужили поводом возобновить терапию афатинибом в дозе 40 мг в сутки. После 1 месяца лечения при контрольном осмотре в январе 2019 года пациент отмечал положительную клиническую динамику, которая заключалась в уменьшение одышки, болей в грудной клетке. Продолжен прием афатиниба в прежней дозе до 22.04.2019 г. при этом клинически у пациента сохранялась стабилизация, но при проведении КТ органов грудной клетки и органов брюшной полости выявлен рост метастатических очагов в легких, что послужило поводом смены режима лечения. Надо отметить, что положительная динамика сохранялась в течение 4 месяцев при возобновлении терапии афатинибом.

Начиная с 22.05.2019 г. переведен на терапию навельбином 120 мг в 1-й и 8-й день, однако на фоне приема препарата в течение последующих 2 недель возникло бурное прогрессирование заболевания, что привело к смерти больного.

Таким образом, общая продолжительность терапии составила 26 месяцев (2 года и 2 месяца).

Клинический случай №2

Пациент Х. 1956 года рождения. В январе 2016 года при прохождении ежегодной ФЛГ была выявлена тень в области нижней доли левого легкого. Ранее по ФЛГ без патологии. Пациент обратился в ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер», где было выполнено расширенное обследование, в том числе КТ органов грудной клетки, по данным которой определены признаки образования в нижней доле левого легкого, предположительно периферический рак. С учетом данных обследования 12.02.2016 г. выполнена торакоскопическая нижняя лобэктомия слева с систематической медиастинальной лимфодиссекцией. Гистологическое заключение: умеренно дифференцированная аденокарцинома легкого, метастазы во 2-х перибронхиальных л/узлах. Установлен диагноз: периферический рак нижней доли левого легкого T1aN1M0. IIВ стадия. В рамках комплексной терапии проведено 3 курса адъювантной полихимиотерапии (ПХТ) по схеме: цисплатин 80 мг/м² в 1-й день, этопозид 120 мг/м² в 1-й, 2-й, 3-й дни, 1 раз в 21 день.

Адъювантная ПХТ закончена в июне 2016 года, тогда же у пациента появились жалобы на боли в позвоночнике, что послужило поводом выполнить больному КТ органов грудной клетки и остеосцинтиграфию (ОСГ). По результатам обследования выявлено метастатическое поражение грудных позвонков (Рисунок 32 а, б). С учетом гистологической формы рака легкого и выявленного прогрессирования заболевания произведено молекулярно-генетическое тестирование гистологического материала на наличие драйверных мутаций. Была выявлена мутация в гене *EGFR* в 21 экзоне (L858R). С июня 2016 года пациент начал принимать гефитиниб 250 мг 1 раз в сутки + золедроновая кислота внутривенно капельно 1 раз в 3 недели.

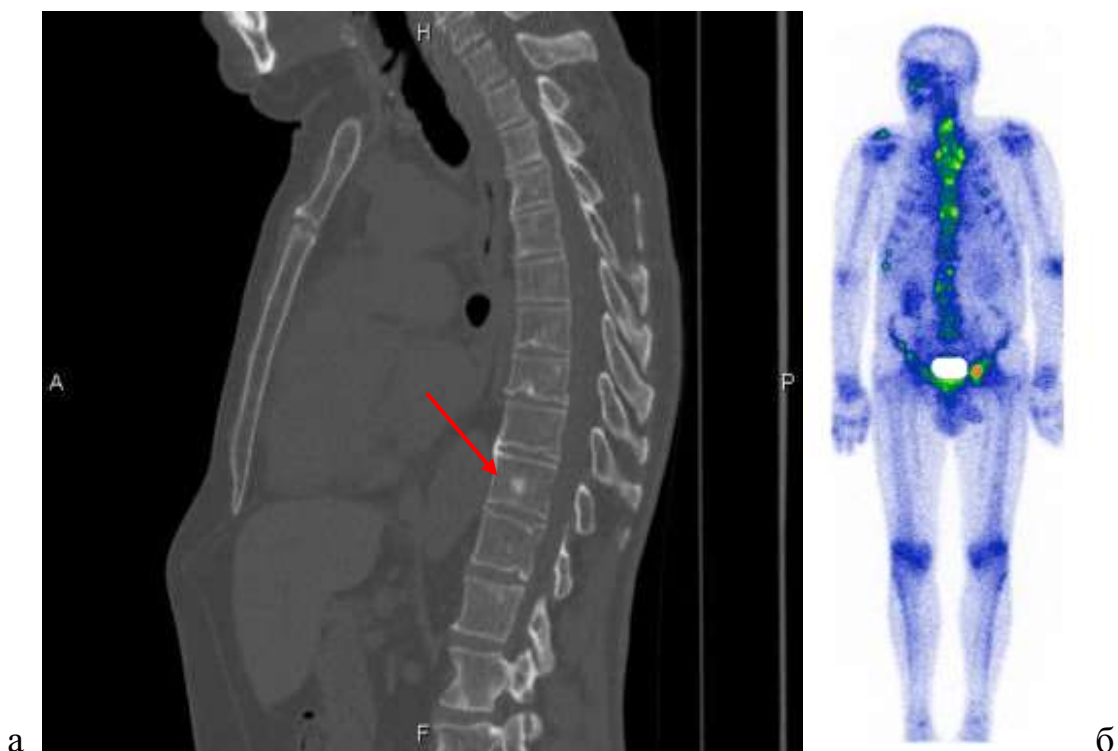


Рисунок 32 – Компьютерная томография органов грудной клетки и остеосцинтиграфия: а) – бластический метастатический очаг в грудном позвонке (указан стрелкой); б) – накопление радиофармпрепарата в грудном позвонке

При контрольной КТ органов грудной клетки через 2 месяца от начала таргетной терапии (август 2016 года) выявлено прогрессирование заболевания за счет увеличения количества и размеров метастазов в кости (поражение всех грудных позвонков, грудины) (Рисунок 33).

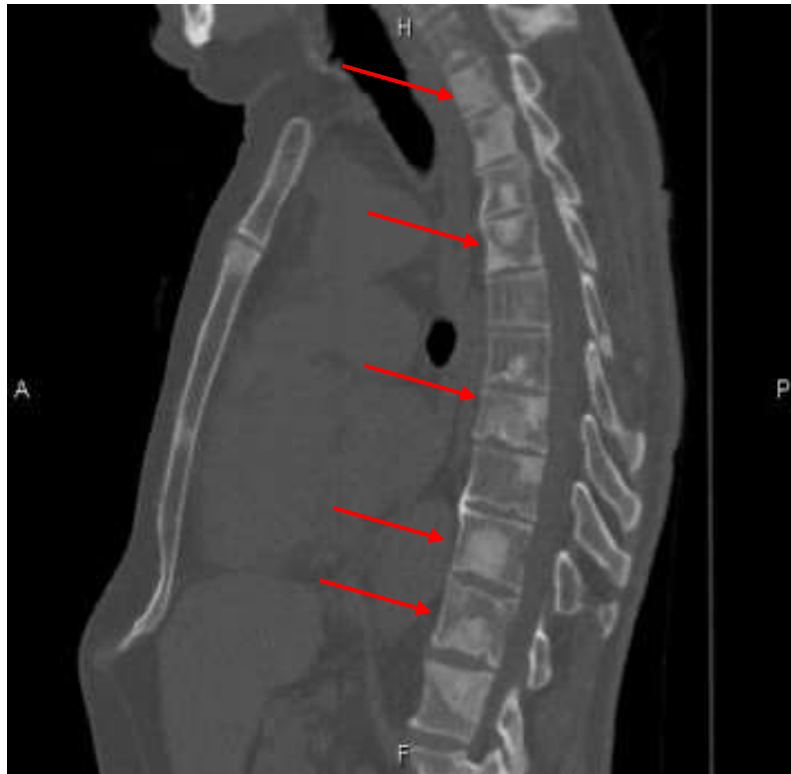


Рисунок 33 – Компьютерная томография органов грудной клетки. Множественные метастатические очаги в грудных позвонках и грудине (указаны стрелками)

С августа 2016 года по февраль 2017 года пациент получил 6 курсов ПХТ по схеме пеметрексед 500 мг/м^2 + цисплатин 75 мг/м^2 + золедроновая кислота. Состояние пациента по шкале ECOG 0-1, сохранялся умеренный болевой синдром в костях. При КТ-контроле в февраль 2017 года отмечена стабилизация заболевания (нарастали склеротические изменения в грудных позвонках), с учетом этого было продолжено введение пеметрекседа в прежней дозе в монорежиме, как поддерживающая терапия.

В мае 2017 года у пациента отмечено ухудшение общего состояния, появился выраженный болевой синдром в позвоночнике и костях таза, слабость. Больной переведен на наркотические анальгетики. Выполнена КТ органов грудной клетки, брюшной полости и остеосцинтиграфия. По результатам обследования у пациента отмечено прогрессирование заболевания за счет метастатического поражения печени и тотального метастатического поражения скелета (Рисунки 34 и 35).

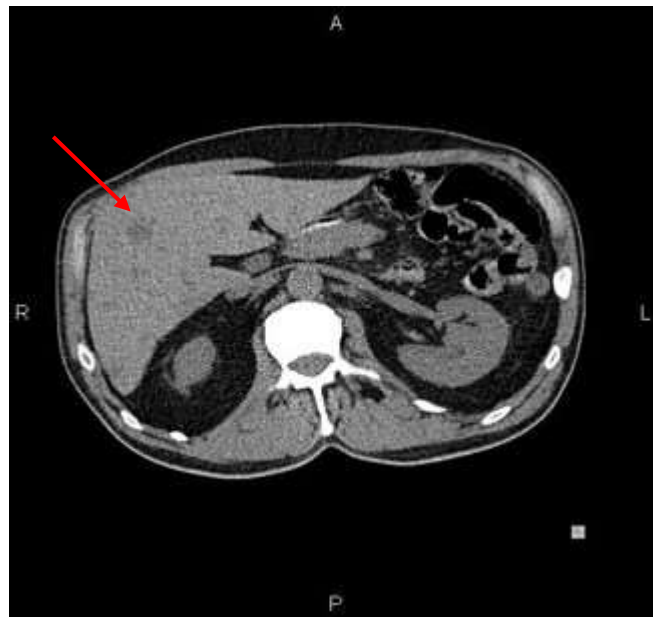


Рисунок 34 – Компьютерная томография органов брюшной полости.
Метастатический очаг в правой доле печени (указан стрелкой)

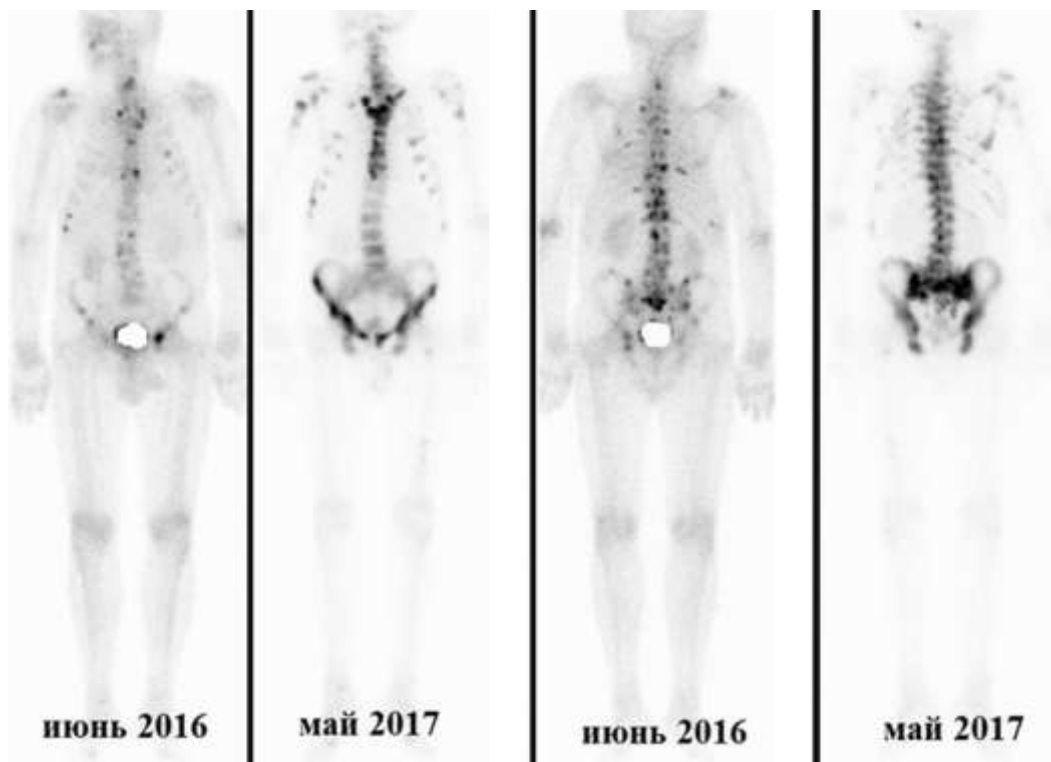


Рисунок 35 – Остеосцинтиграфия. Тотальное метастатическое поражение скелета

Пациент переведен на терапию афатинибом в дозе 50 мг в сутки. При этом у больного отмечалась хорошая переносимость лечения. Из нежелательных явлений у больного выявлены сыпь в волосистой части головы и диарея 1-й степени. Данные нежелательные явления не требовали медикаментозной коррекции и не снижали качество жизни пациента. Особенностью клинического течения является яркий клинический эффект после смены терапии, который заключается в быстром и полном купировании (в течение 1 недели) болевого синдрома и улучшении общего состояния. При контрольной КТ органов грудной клетки и брюшной полости через 1,5 месяца отмечено исчезновение метастатического очага в печени (Рисунок 36).

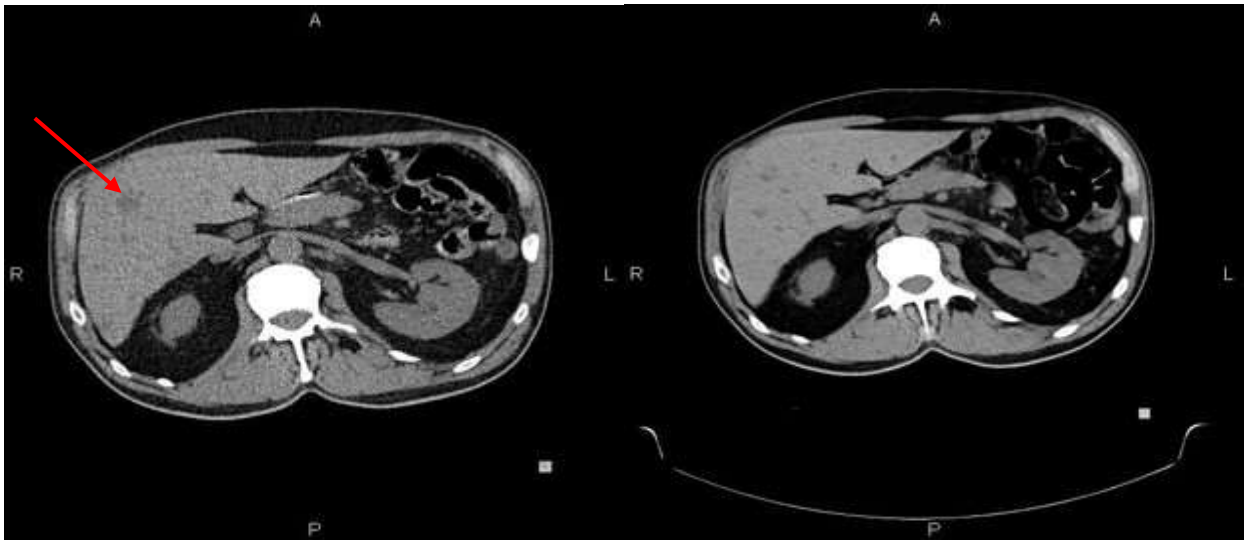


Рисунок 36 – Компьютерная томография органов брюшной полости. Слева стрелкой указан метастатический очаг в печени до начала таргетной терапии, справа исчезновение метастатического очага в печени на фоне проводимого лечения

Лечение афатинибом продолжалось в течение 10 месяцев до марта 2018 года, когда вновь появились боли в костях, нарастала слабость, тяжесть в правом подреберье. По данным КТ органов брюшной полости выявлены множественные метастазы в печень (Рисунок 37).



Рисунок 37 – Компьютерная томография органов брюшной полости.
Метастатическое поражение печени (метастатический очаг указан стрелкой)

Принимая во внимание прогрессирования на фоне приема ИТК, выполнена «жидкая» биопсия, забор плазмы для определения мутации резистентности. По результатам анализа, в плазме больного выявлены две мутации исходная L858R и новая мутация резистентности к ИТК T790M. Исходя из этого, назначен ИТК третьего поколения – осимертиниб 80 мг в сутки. И вновь была отмечена особенность течения заболевания в выраженном клиническом ответе с купированием болевого синдрома и улучшением общего состояния. Продолжительность лечения осимертинибом составила еще 10 месяцев до января 2019 года, когда состояние больного резко ухудшилось за счет появления мозговой симптоматики, что вызвало кому. Далее на фоне проводимой симптоматической терапии наступила смерть больного. Длительность лечения от констатации метастатического процесса составила 32 месяца.

3.4 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 [243].

При изучении количества подтипов ДК и свойств у больных НМРЛ были выявлены изменения в относительном количестве подтипов ДК между группой здоровых доноров и больных НМРЛ. У больных 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 (Рисунок 38). Однако при этом не было выявлено статистически значимых различий в соотношении подтипов мДК и пДК в периферической крови в группах условно здоровых доноров и больных НМРЛ.

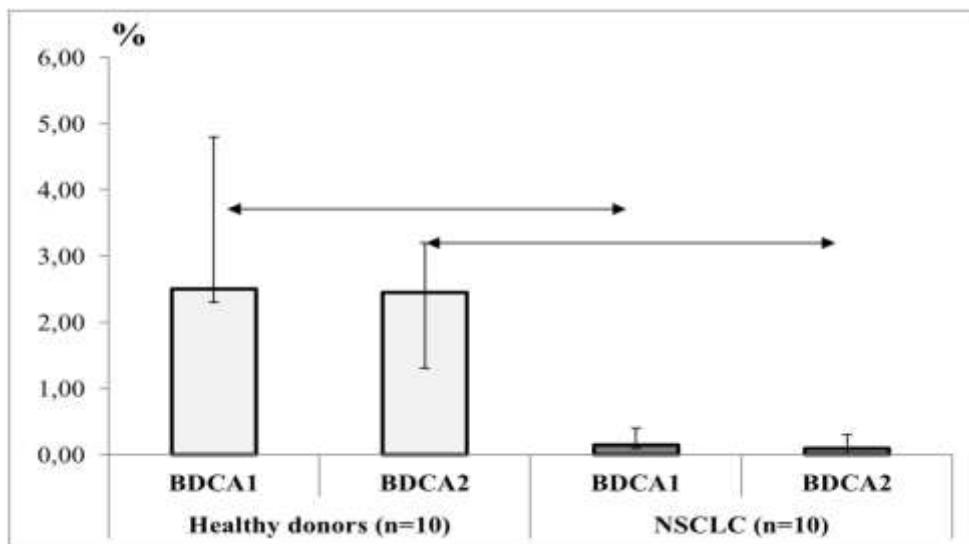


Рисунок 37 – Относительное количество миелоидных дендритных клеток и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркеры BDCA1 и BDCA2 среди $lin^{-}/CD45^{+}$ клеток (данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при $p < 0,05$, критерий Wilcoxon)

Одним из признаков снижения функциональной активности дендритных клеток при злокачественных заболеваниях может быть недостаточный уровень «зрелости» клеток, который связан как с фенотипическими различиями в экспрессии мембраносвязанных маркеров, так и с различиями в функциональной активности по способности к захвату антигена, его презентации и последующей миграции в лимфоидные органы. По мере созревания дендритных клеток возрастает уровень экспрессии на ее поверхности ко-стимулирующих молекул. На ранних стадиях созревания начинает экспрессироваться CD86, в то время как экспрессия CD83 характерна для более зрелых ДК. Для того чтобы оценить способность ДК больных НМРЛ к созреванию, были использованы агонисты толл-подобного рецептора (TLR) 4,7 и 8 (R848 и LPS), которые способны индуцировать созревание как мДК, так и пДК, с последующей оценкой уровня экспрессии ко-стимулирующих молекул. 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 (Рисунок 39).

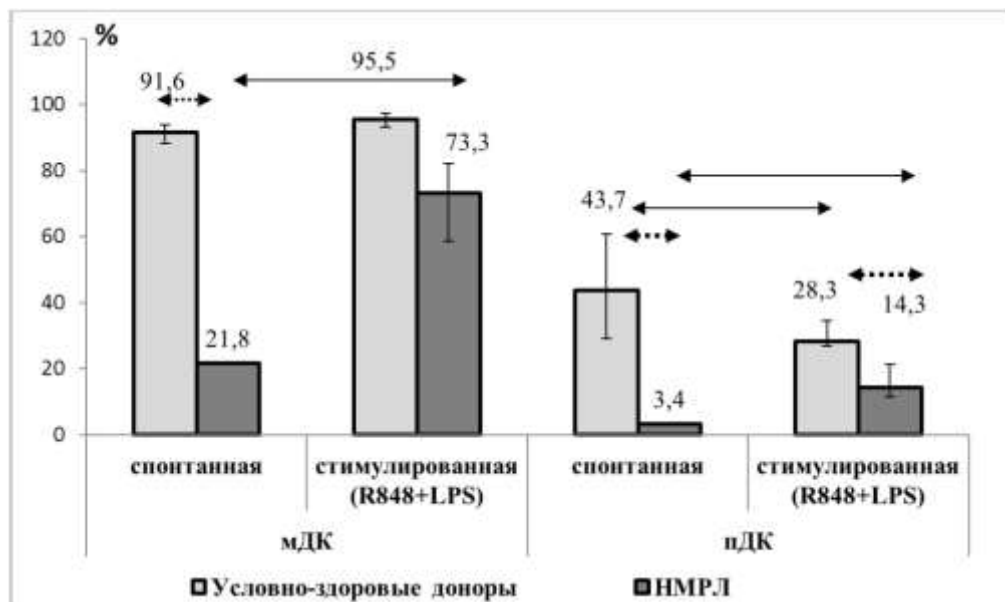


Рисунок 39 – Относительное количество миелоидных дендритных клеток и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CD86 среди $\text{lin}^-/\text{CD45}^+/\text{BDCA}^+$ клеток (здоровые доноры $n = 10$, больные НМРЛ $n = 10$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при $p < 0,05$, критерий Wilcoxon

Было установлено, что экспрессия CD83 на обеих субпопуляциях ДК как у здоровых доноров, так и у больных НМРЛ в пробах без стимуляции не детектировалось. Однако после стимуляции наблюдалось достоверное увеличение количества клеток экспрессирующих CD83 во всех исследуемых группах. Число CD83+ клеток в популяции мДК больных НМРЛ после стимуляции было достоверно ниже по сравнению с группой условно здоровых доноров (Рисунок 40). Для оценки функциональных характеристик использовали маркер С-С-рецептор хемокина 7 (CCR-7) как индикатор миграционной способности ДК. При определении функциональной характеристики дендритных клеток периферической крови показано, что количество клеток экспрессирующих CCR-7 у больных как до, так и после стимуляции было ниже чувствительности детектируемых проточным флуориметром значений, тогда как у здоровых

доноров в ответ на стимул R848 и LPS происходило достоверное увеличение клеток с экспрессией CCR7.

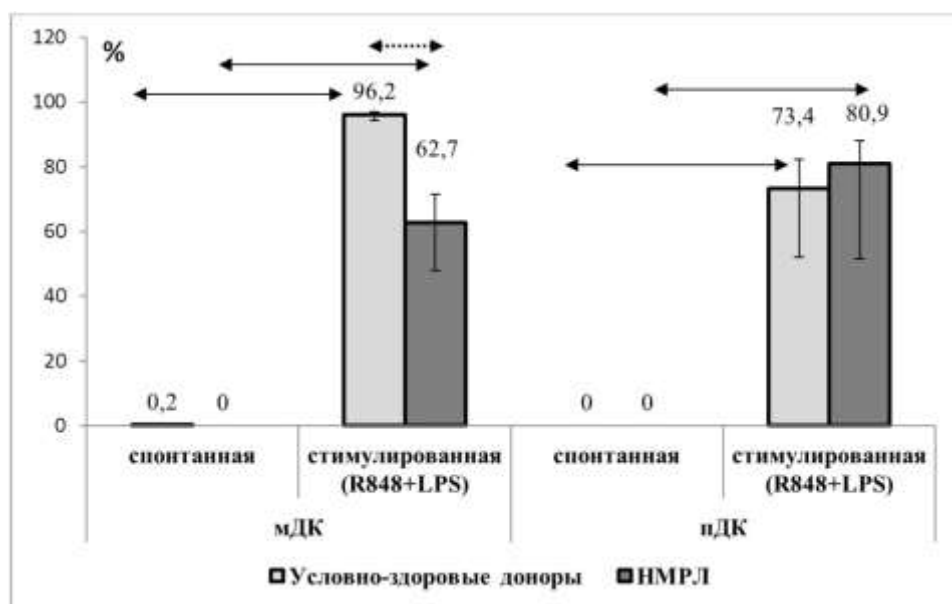


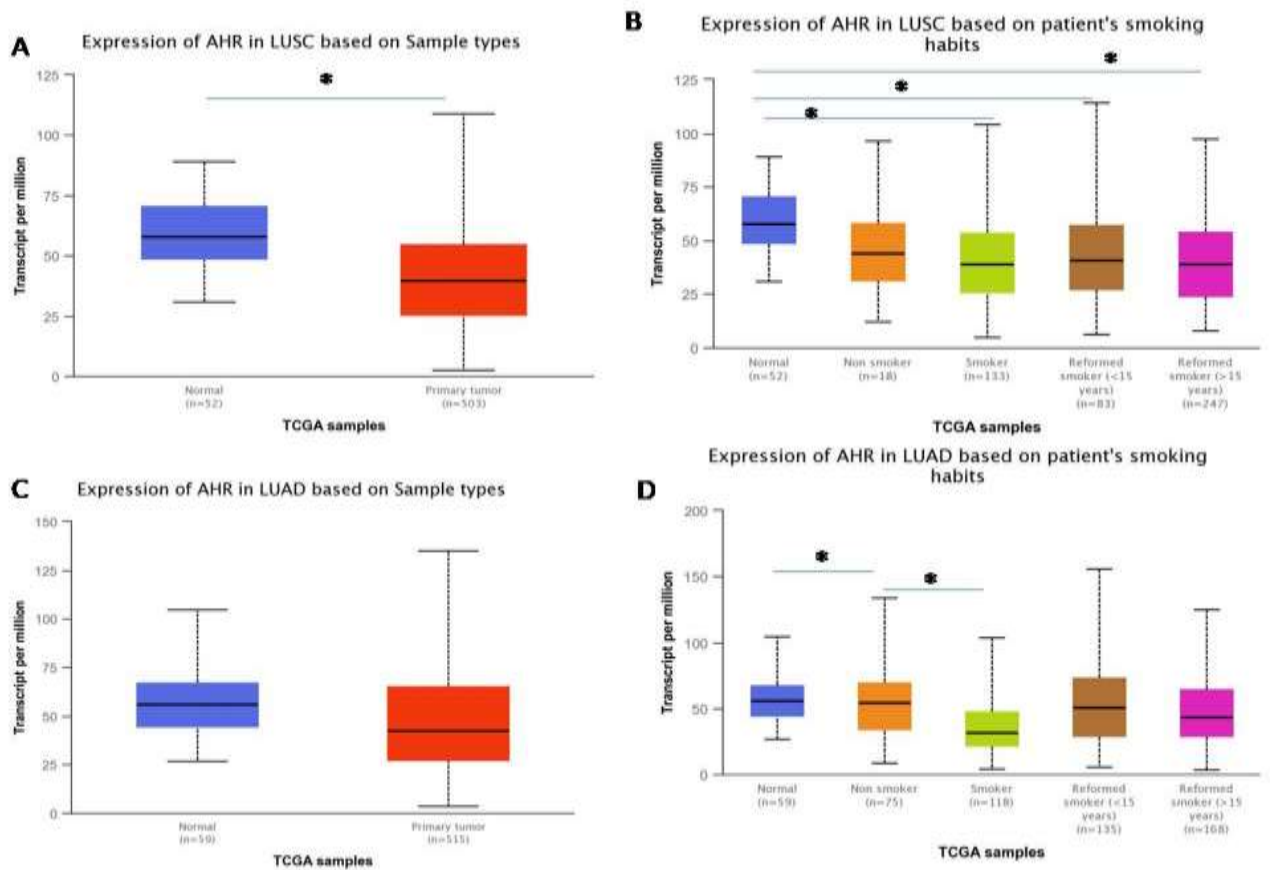
Рисунок 40 – Относительное количество миелоидных дендритных клеток и плазмоцитоидных дендритных клеток, экспрессирующих маркер CD83 среди $\text{lin}^-/\text{CD45}^+/\text{BDCA}^+$ клеток (здоровые доноры $n = 10$, больные НМРЛ $n = 10$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой на рисунке обозначены статистические значимые отличия при $p < 0,05$, критерий Wilcoxon

Таким образом, при исследовании фенотипических и функциональных характеристик дендритных клеток периферической крови больных НМРЛ было выявлено достоверно более низкое содержание мДК и пДК по сравнению с группой условно здоровых доноров, а также установлено снижение способности к созреванию и миграции всех субпопуляций ДК при НМРЛ.

3.5 Биоинформатический анализ

Биоинформатический анализ уровня экспрессии AhR в опухолевых тканях НМРЛ в зависимости от курения.

Анализ уровня экспрессии гена *AhR* проводился нами с использованием базы данных UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>), которая включает 503 случая ПКРЛ и 515 случаев АКЛ. Результаты показали, что по сравнению с нормальной тканью (контрольная группа) экспрессия мРНК *AhR* была достоверно снижена в опухолевых тканях ПКРЛ и АКЛ (Рисунок 41).



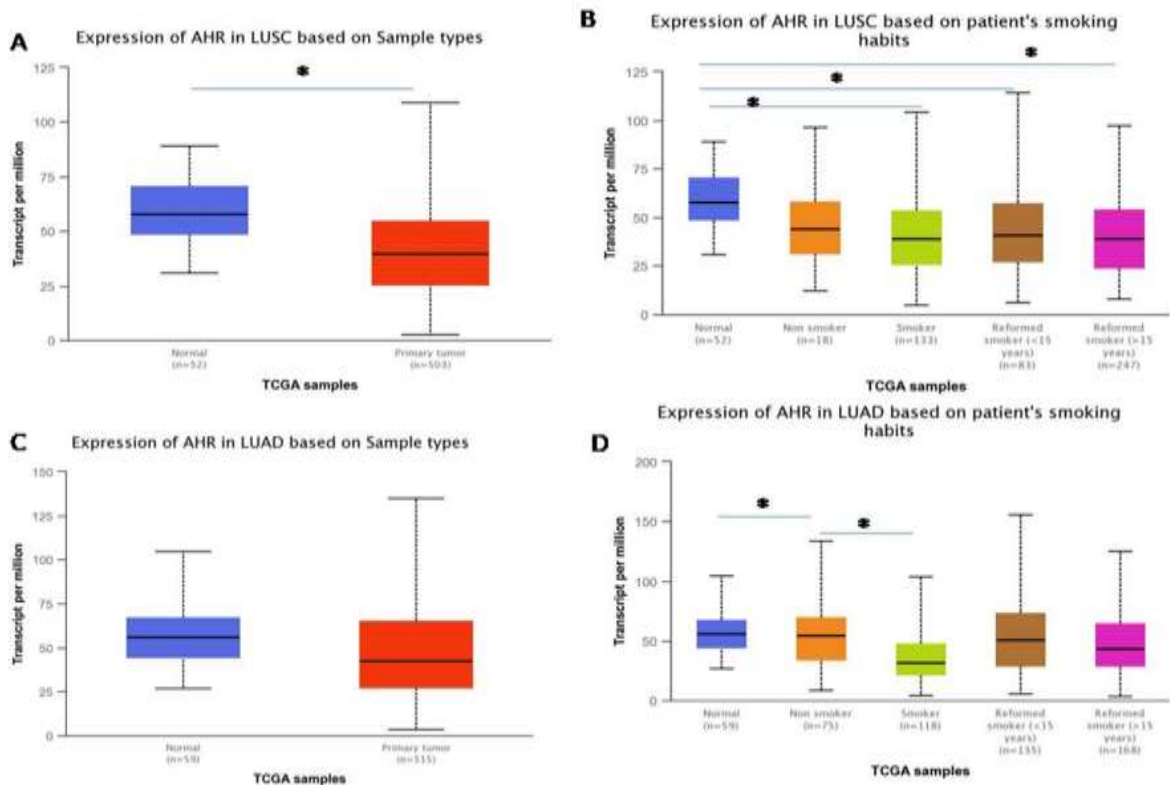
Примечание: * – $p < 0,05$ (LUSC – плоскоклеточный рак легкого; LUAD – аденокарцинома легкого).

Рисунок 41 – Уровень экспрессии гена *AhR* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого (A) и аденокарциномы легкого (C) и в зависимости от статуса курения в образцах плоскоклеточного рака легкого (B) и аденокарциномы легкого (D)

При делении образцов с учетом их статуса курения (некурящие, курильщики, бросившие курить менее 15 лет назад, бросившие курить более 15 лет назад) в группе ПКРЛ достоверных отличий между группами выявлено не было. В то же время при анализе образцов АКЛ показано достоверное снижение уровня мРНК *AhR* относительно группы некурящих пациентов (см. рисунок 41 В, D).

*Биоинформатический анализ уровня метилирования промотора гена *AhR* в опухолевых тканях НМРЛ в зависимости от курения.*

Данный анализ продемонстрировал достоверное снижение уровня метилирования промотора гена *AhR* как в случае ПКРЛ, так и АКЛ (Рисунок 42 А, С).



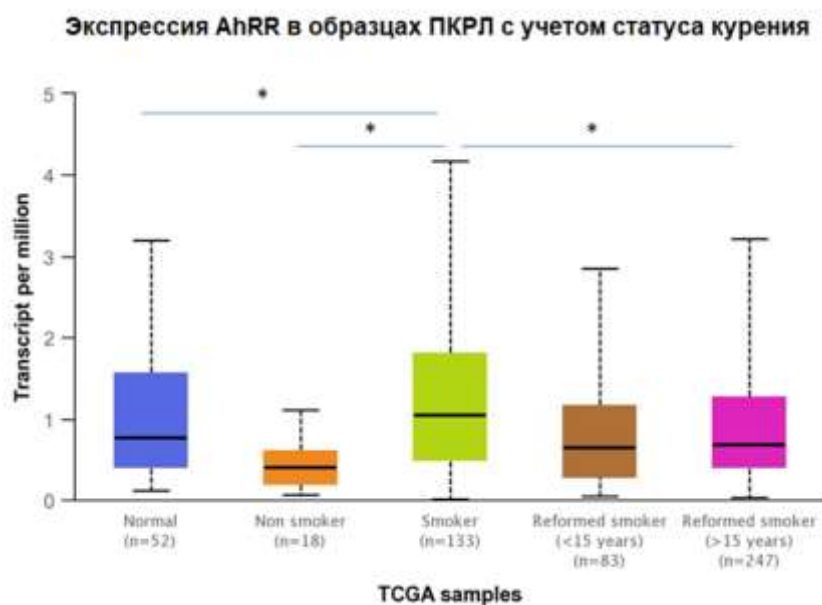
Примечание: * – $p < 0,05$ (LUSC – плоскоклеточный рак легкого; LUAD – аденокарцинома легкого).

Рисунок 42 – Уровень метилирования промотора гена *AhR* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого (A) и аденокарциномы легкого (C) и в зависимости от статуса курения в образцах плоскоклеточного рака легкого (B) и аденокарциномы легкого (D)

Как видно на рисунке 42 В и рисунке 42 D статус «курение» не вносил достоверного изменения в уровень метилирования гена *AhR*.

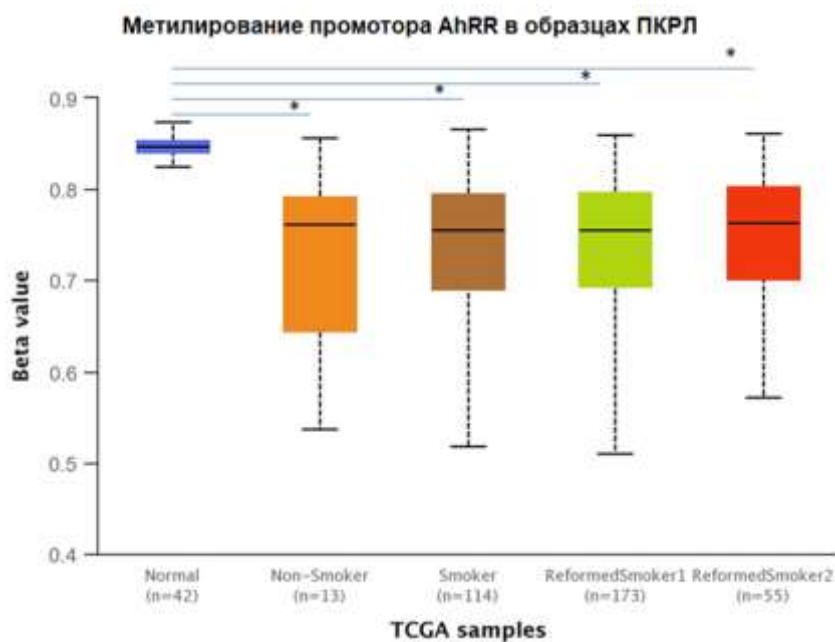
Биоинформатический анализ экспрессии гена AhRR и уровня его метилирования в опухолевых тканях ПКРЛ в зависимости от курения

По данным TCGA экспрессия *AhRR* у курильщиков повышена по сравнению с нормой и не курильщиками (Рисунок 43). Показатели уровня метилирования промотора гена *AhRR* были снижены независимо от статуса курения (Рисунок 44).



Примечание: * – $p < 0,05$.

Рисунок 43 – Экспрессия гена *AhRR* в опухолях курящих и некурящих пациентов с плоскоклеточным раком легкого



Примечание: * – $p < 0,05$.

Рисунок 44 – Уровень метилирования промотора гена *AhRR* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого в зависимости от статуса курения

Биоинформатический анализ выживаемости в зависимости от уровня экспрессии AhR и AhRR.

В результате анализа данных TCGA были получены кривые выживаемости в зависимости от уровня экспрессии *AhR* и *AhRR* отдельно для АКЛ и ПКРЛ [355] (Рисунок 45, 46 и 47).

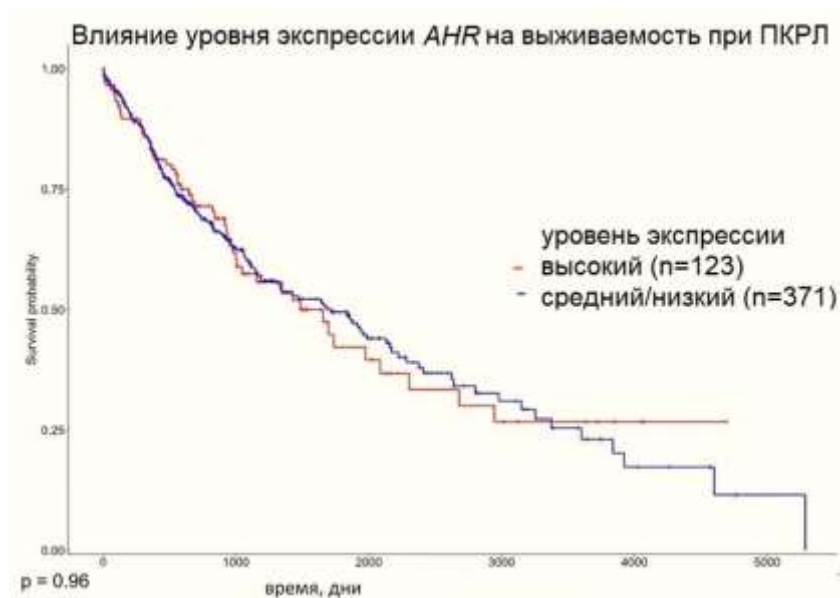


Рисунок 45 – Влияние различных уровней экспрессии *AhR* на выживаемость пациентов с плоскоклеточным раком легкого

Различия в выживаемости для ПКРЛ в зависимости от экспрессии *AhR* не достоверны, $p = 0,96$.

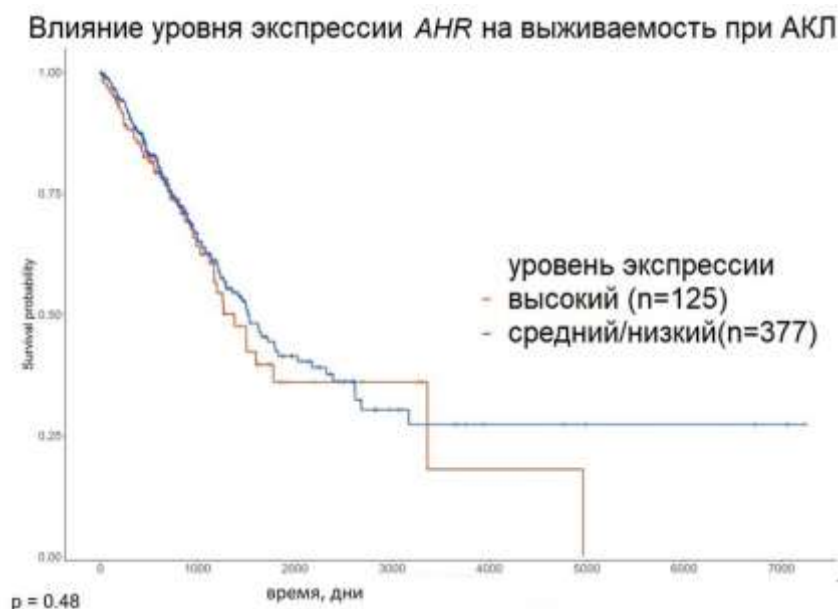


Рисунок 46 – Влияние различных уровней экспрессии *AhR* на выживаемость пациентов с аденокарциномой легкого

Различия в выживаемости для АКЛ в зависимости от экспрессии *AhR* не достоверны, $p = 0,48$.

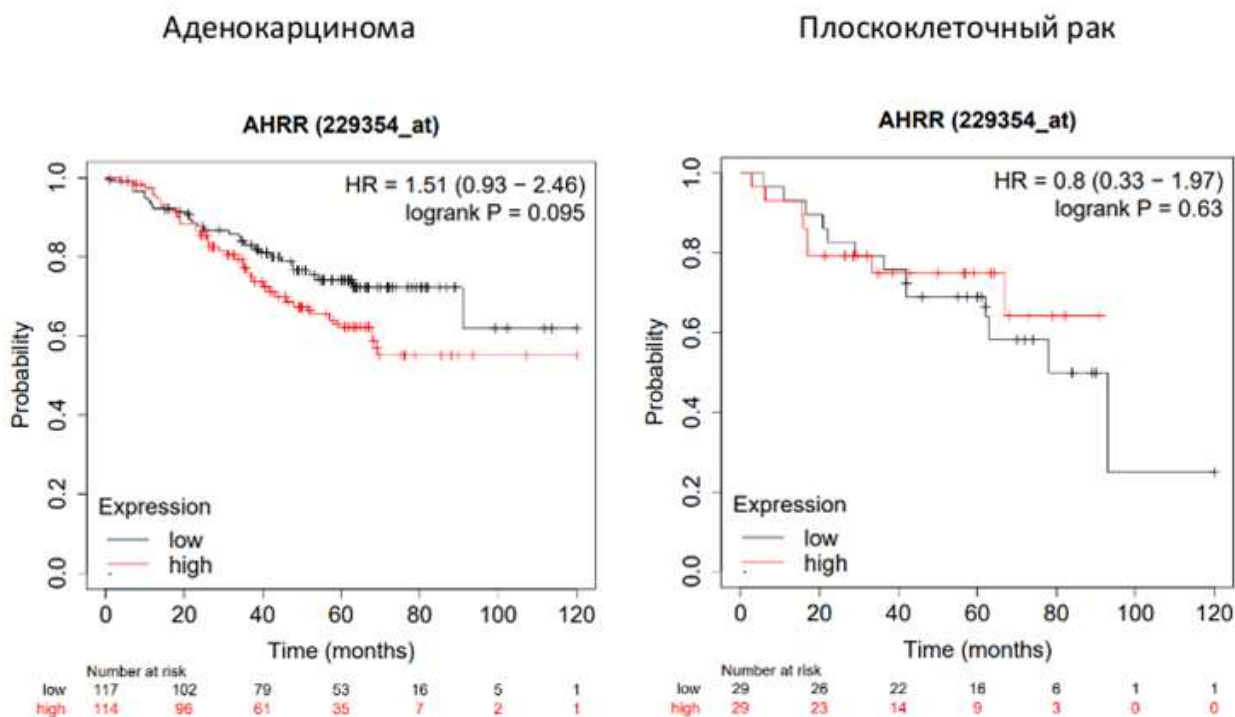
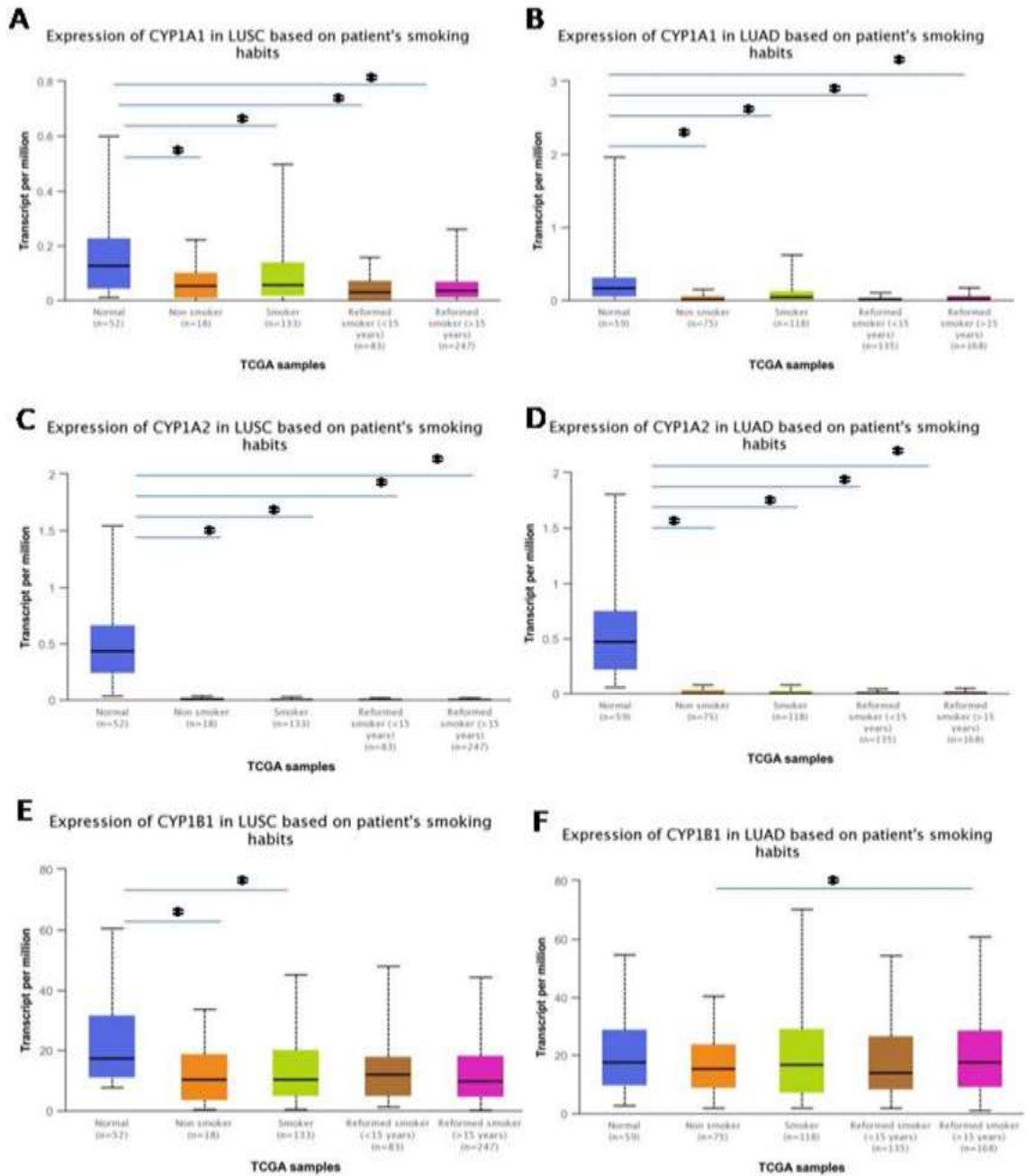


Рисунок 47 – Выживаемость пациентов с аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком легкого в зависимости от экспрессии *AhRR*

Различия в выживаемости для АКЛ и ПКРЛ в зависимости от экспрессии *AhRR* не достоверны для обоих гистотипов ($p = 0,095$ и $p = 0,63$ соответственно).

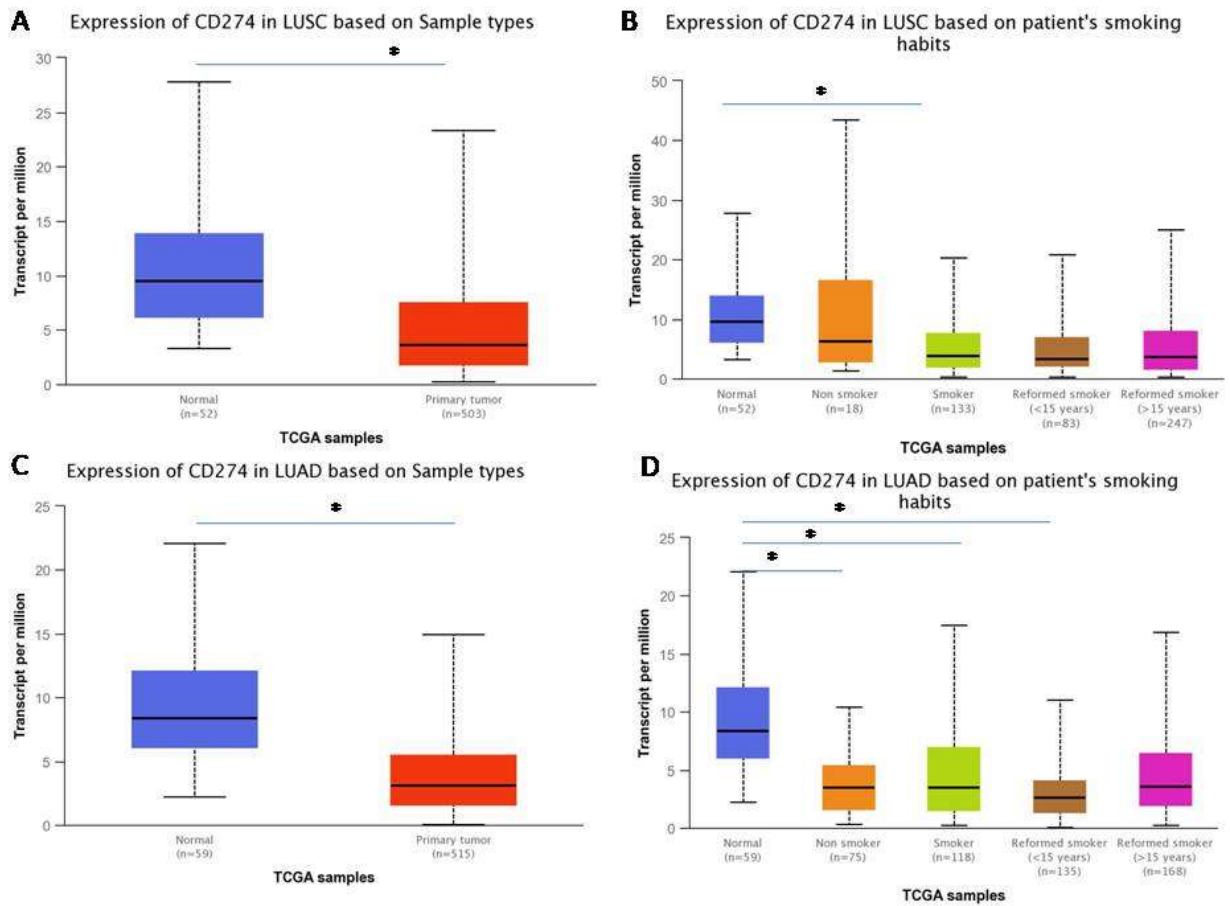
Биоинформатический анализ уровня экспрессии генов-мишеней AhR в опухолевых тканях НМРЛ в зависимости от курения

С использование 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 (Рисунок 48). Данные, полученные от образцов опухолевых тканей, были сформированы в группы на основании статуса курения пациентов. Кроме того, было изучено изменение уровня экспрессии гена *CD274* в опухолевых тканях ПКРЛ и АКЛ по сравнению с нормой (Рисунок 49).



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

Рисунок 48 – Уровень экспрессии генов-мишеней AhR – *CYP1A1* (A, B), *CYP1A2* (C, D), *CYP1B1* (E, F) в опухолевых тканях в зависимости от статуса курения пациента в образцах плоскоклеточного рака легкого (A, C, E) и аденокарциномы легкого (B, D, F)



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

Рисунок 49 – Уровень экспрессии гена *CD274* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого (А) и аденокарциномы легкого (С) и в зависимости от статуса курения пациента в образцах плоскоклеточного рака легкого (В) и аденокарциномы легкого (D)

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 (см. рисунок 48). 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 (см. рисунок 48).

Биоинформатический анализ нарушения функций PTEN

Используя портал cBioPortal, мы оценили нарушение функций PTEN в выборках АКЛ и ПКРЛ. Такой портал (<https://www.cbioportal.org/>) представляет собой удобный инструмент, объединяющий данные проектов TCGA и Международного консорциума генома рака (ICGC), который может визуализировать и анализировать данные многомерной геномики рака, включая экспрессию генов, изменение количества копий генов, мутации генов (Рисунок 50).

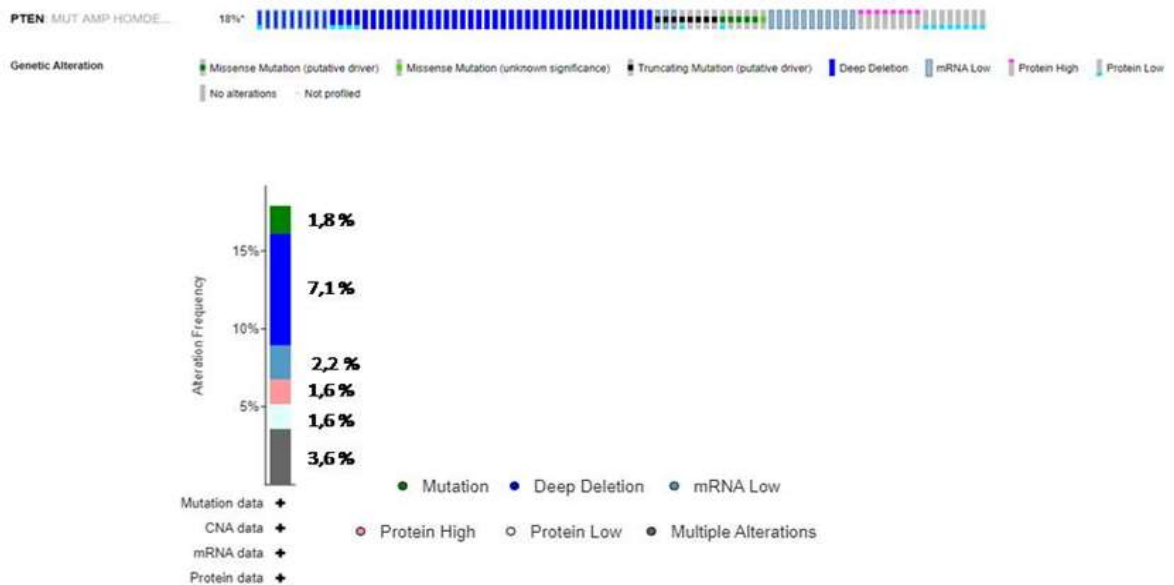
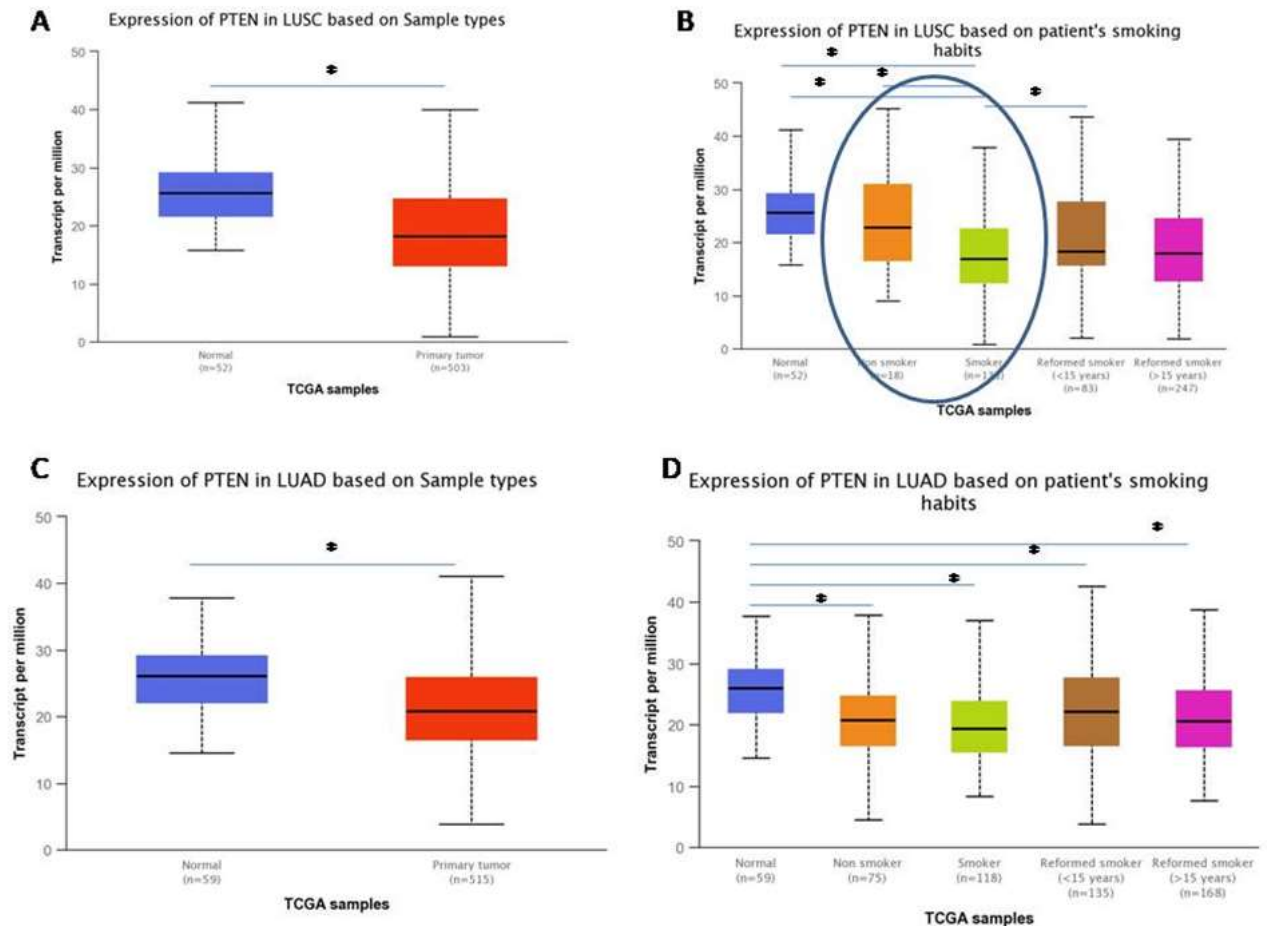


Рисунок 50 – Нарушения PTEN, выявленные у пациентов с плоскоклеточным раком легкого и с аденокарциномой легкого

Мы обнаружили, что разнообразные нарушения PTEN значительно чаще регистрируются у пациентов с ПКРЛ (18%), чем у пациентов с АКЛ (менее 2% случаев), при этом у пациентов с ПКРЛ доля мутаций среди всех нарушений PTEN составляет менее 2%.

Биоинформатический анализ уровня экспрессии гена *PTEN* и метилирование его промотора в опухолевых тканях НМРЛ в зависимости от статуса курения

Мы проанализировали уровень мРНК *PTEN* в опухолевых тканях ПКРЛ и АКЛ, используя базу данных UALCAN (Рисунок 51).

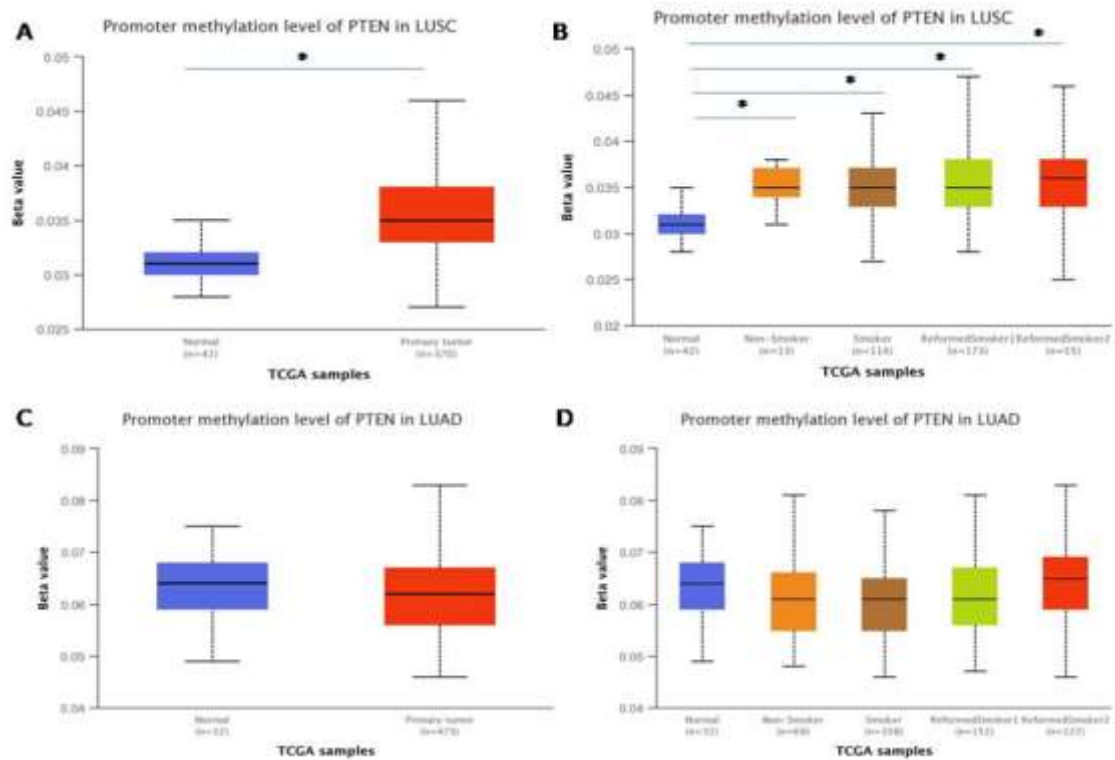


Примечание: * – $p < 0,05$ (LUSC – ПКРЛ; LUAD – АКЛ).

Рисунок 51 – 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)

Анализ экспрессии гена *PTEN* показал, что его уровень снижается в опухолевых тканях как пациентов с ПКРЛ, так и пациентов с АКЛ (см. рисунок 51 А, С). Однако при распределении образцов по статусу курения пациентов было обнаружено, что курение вызывает достоверное снижение уровня мРНК *PTEN* только у пациентов ПКРЛ (см. рисунок 51 В). В опухолевых тканях АКЛ курение не оказывало достоверного влияния на экспрессию гена *PTEN* (см. рисунок 51 D).

При изучении метилирования ДНК *PTEN* использовался онлайн-инструмент UALCAN. Результаты показали значительное повышение уровня метилирования промотора *PTEN* в образцах ПКРЛ (Рисунок 52 А).



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

Рисунок 52 – Уровень метилирования промотора гена *PTEN* в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого (А) и аденокарциномы легкого (С) и в зависимости от статуса курения пациента в образцах плоскоклеточного рака легкого (В) и аденокарциномы легкого (D)

В то же время, результаты показали, что уровень метилирования не зависел от статуса курения пациентов (см. рисунок 52 В). Для сравнения: в образцах АКЛ не показано значительного изменения метилирования промотора гена *PTEN* по сравнению с нормальными тканями (см. рисунок 52 С) и при сравнении групп пациентов, распределенных по статусу курения (см. рисунок 52 D).

Отбор микроРНК и их генов-мишеней с помощью биоинформатического анализа, в опухолевых тканях НМПЛ

Чтобы найти микроРНК, потенциально регулируемые AhR, мы использовали ранее опубликованный набор белок-кодирующих генов человека и крысы, в промоторных областях которых (от -5 000 до +2 000 п. н.) был предсказан DRE [74], и извлекли из него гены, содержащие интронные микроРНК. Кроме этого, мы также искали последовательность мотива DRE в предполагаемых промоторах микроРНК-кодирующих генов с использованием Biostrings (пакет R Bioconductor) и позиционной весовой матрицы, основанной на 13 подлинных последовательностях DRE, перечисленных в исследовании Sun с соавторами [74]. Среди найденных микроРНК были выбраны те, чьи гены-мишени на высоком уровне экспрессируются в ткани легкого (по данным The Human Protein Atlas, URL: <https://www.proteinatlas.org/>) и представляют наибольший интерес в канцерогенезе легкого [332]. Гены-мишени исследуемых микроРНК были найдены с использованием ресурса TargetScan [326]. Отобранные таким способом микроРНК и их гены-мишени для крыс и человека представлены в Таблицах 24 и 25.

Таблица 24 – МикроРНК, потенциально регулируемые AhR у человека и крысы, их гены-хозяева и гены-мишени (miR – микроРНК)

| Ген-хозяин | МикроРНК | Гены-мишени у крыс | Гены-мишени у человека |
|----------------|-------------|--|---|
| <i>MIR22HG</i> | miR-22-3p | <i>PTEN</i> | <i>PTEN</i> |
| межгенная | miR-29a-3p | <i>IGF1, PTEN, AhR, EMP2, ITGA6, AhRR, SLC34A2</i> | <i>IGF1, PTEN, AhR, EMP2, ITGA6, AR</i> |
| межгенная | miR-193b-5p | <i>IGF1, SLC34A2</i> | <i>AhRR, IGF2</i> |
| <i>IGF2</i> | miR-483-3p | <i>IGF1, PTEN, AhR, EMP2, AR</i> | <i>IGF1, AHR, EMP2, SLC34A2, ROS1</i> |

Таблица 25 – МикроРНК, потенциально регулируемые AhR только у человека, их гены-хозяева и гены-мишени

| Ген-хозяин | МикроРНК | Гены-мишени у человека |
|--------------|------------|--|
| <i>EGFL7</i> | miR-126-3p | <i>ITGA6</i> |
| <i>MCM7</i> | miR-93-5p | <i>PTEN, EMP2, BCL6, AhRR, SLC34A2</i> |

Анализ данных TCGA для человека показал, что уровень экспрессии микроРНК-22 снижен в образцах ПКРЛ и увеличивается в образцах АКЛ, при этом не зависит от курения (Рисунок 53 и 54).

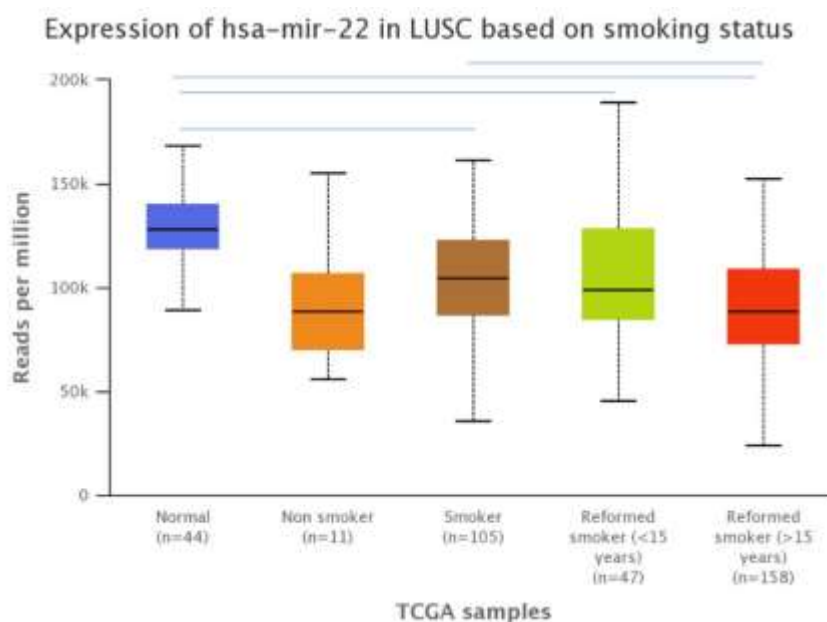


Рисунок 53 – Уровень экспрессии микроРНК-22 в образцах плоскоклеточного рака легкого по данным TCGA (LUSC – плоскоклеточный рак легкого; mir – микроРНК)

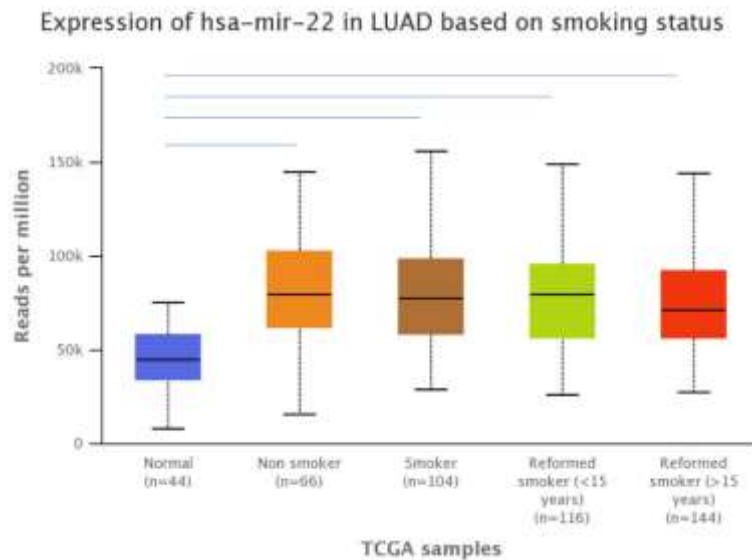


Рисунок 54 – Уровень экспрессии микроРНК-22 в образцах аденокарциномы легкого по данным TCGA (LUAD – аденокарцинома легкого; mir – микроРНК)

В образцах ПКРЛ экспрессия микроРНК-29а снижается почти в три раза (Рисунок 55) и не меняется в образцах АКЛ (Рисунок 56). Как видно из этих результатов, экспрессия микроРНК-29а также не зависит от курения.

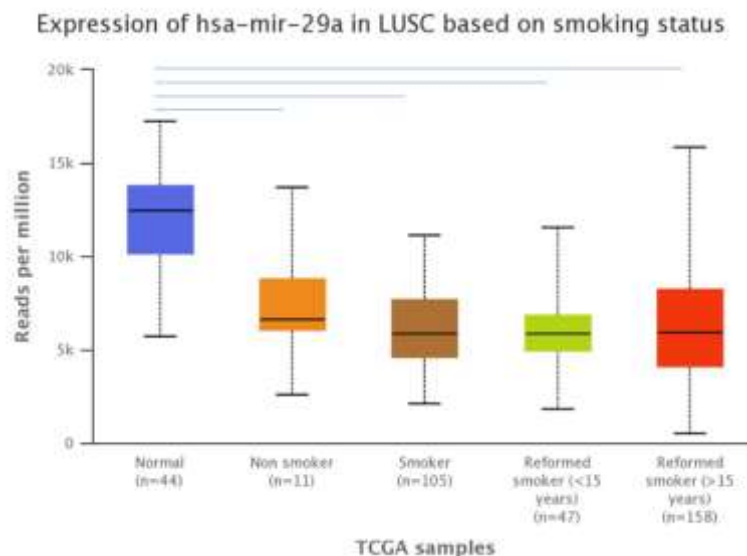


Рисунок 55 – Уровень экспрессии микроРНК-29а в образцах плоскоклеточного рака легкого по данным TCGA (LUSC – плоскоклеточный рака легкого; mir – микроРНК)

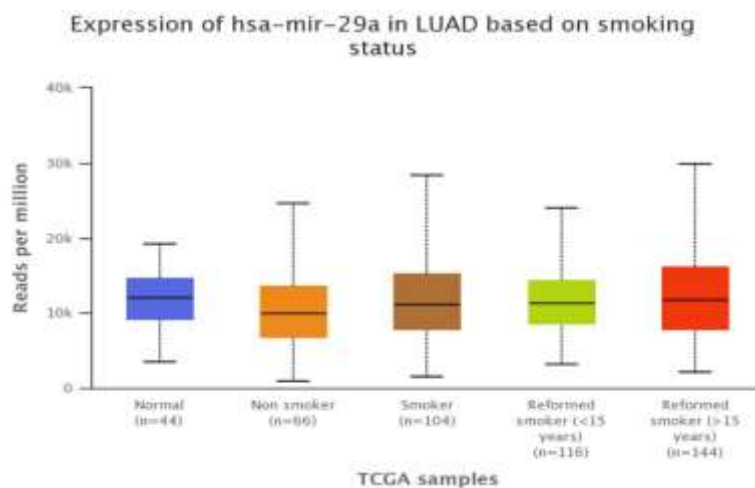


Рисунок 56 – Уровень экспрессии микроРНК-29а в образцах аденокарциномы легкого по данным TCGA (LUAD – аденокарцинома легкого; mir – микроРНК)

Для плоскоклеточного рака легкого человека экспрессия микроРНК-193b многократно повышается независимо от курения (Рисунок 57). Для аденокарциномы показана зависимость экспрессии данной микроРНК от курения (Рисунок 58). Заметных изменений в экспрессии другой AhR-регулируемой микроРНК-483 для ПКРЛ и АКЛ не получено.

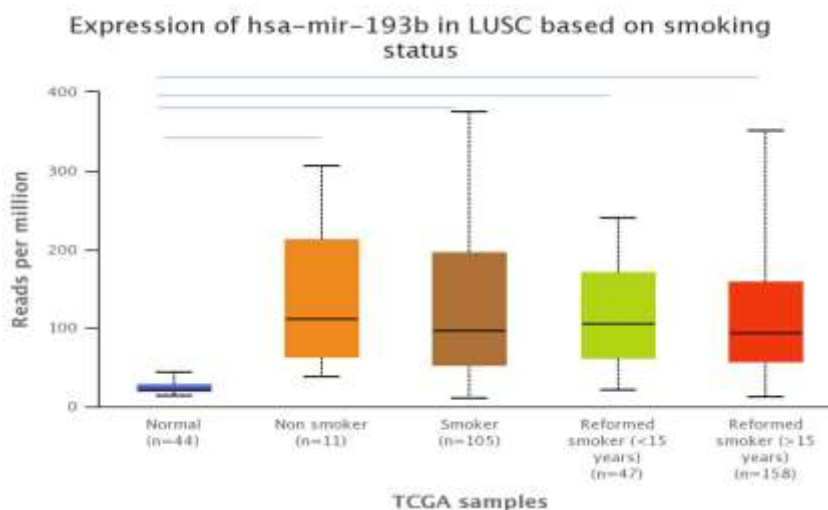


Рисунок 56 – Уровень экспрессии микроРНК-193b в образцах плоскоклеточного рака легкого по данным TCGA (LUSC – плоскоклеточный рак легкого; mir – микроРНК)

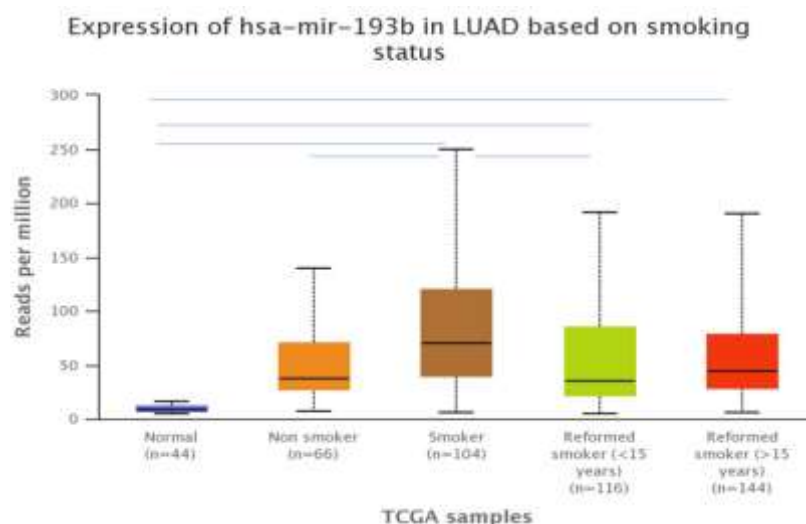


Рисунок 58 – Уровень экспрессии микроРНК-193b в образцах аденокарциномы легкого по данным TCGA (LUAD – аденокарцинома легкого; mir – микроРНК)

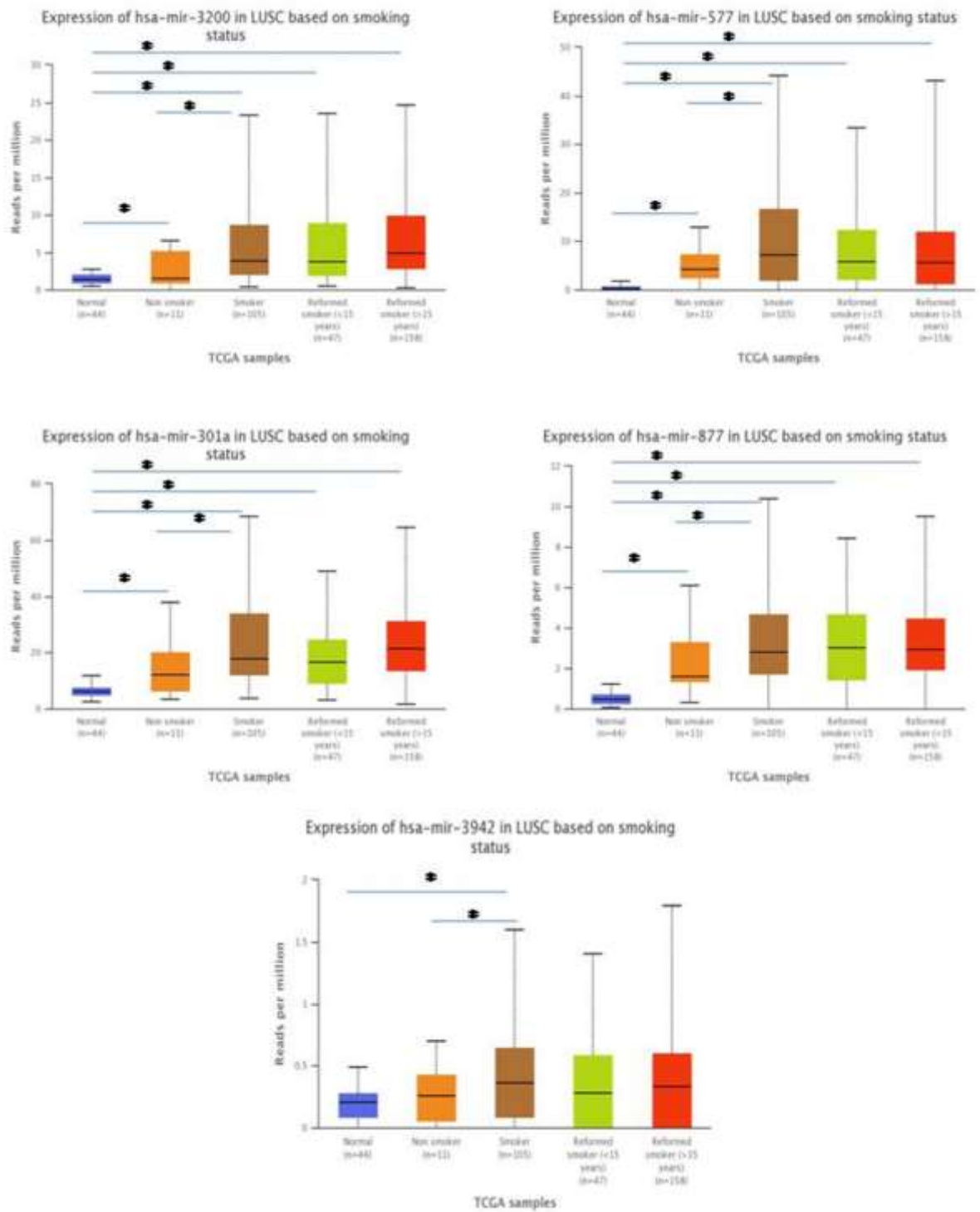
Мы также использовали информацию о положениях DRE в геноме человека из данных ChIP-seq анализа [175], и сравнили координаты DRE с координатами предполагаемых промоторных областей микроРНК. Предполагаемые промоторные области были извлечены из генома человека (hg38) в 10 000 нт от начала последовательности микроРНК-предшественника (согласно miRGeneDB). В исследование были взяты микроРНК в промоторных областях, в которых содержится сайт связывания AhR согласно данным CHEA Transcription Factor Targets, представленных на ресурсе Harmonizome (URL: <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>). Список выявленных таким образом микроРНК и их генов-мишеней представлен в таблице 26.

Таблица 26 – микроРНК, регулируемые AhR согласно анализам ChiP, и их гены-мишени (человек) (miR – микроРНК)

| МикроРНК, потенциально регулируемые AhR [175] | МикроРНК, потенциально регулируемые AhR (данные Harmonizome) | Ген-мишень | Функции белковых продуктов генов-мишеней |
|---|--|-------------|--|
| miR-21-5p miR-342-3p | miR-21-5p miR-146a-5p miR-181a-5p | <i>AR</i> | Регуляция пролиферации и метаболических процессов |
| miR-21-5p miR-93 | miR-21-5p miR-181a-5p | <i>PTEN</i> | Негативный регулятор PI3K/АКТ/mTOR-сигнального пути |
| неприменимо | miR-181a-5p | <i>BCL6</i> | Транскрипционный репрессор, протоонкоген |
| неприменимо | miR-181a-5p | <i>AhR</i> | Транскрипционный фактор, участвует в регуляции ферментов, которые метаболизируют ксенобиотики. |
| miR-342-3p | miR-146a-5p | <i>AhRR</i> | Репрессор арил-гидрокарбонового рецептора |

Дополнительный анализ данных литературы позволил выбрать микроРНК, мишенью которых является PD-L1. К ним относятся AhR-регулируемые микроРНК-181a, -146a и PD-L1-регулирующая микроРНК-155 [211, 212].

Для выявления микроРНК, имеющих корреляцию с экспрессией гена *PTEN*, проведен анализ данных TCGA с использованием модуля LinkFinder базы данных LinkedOmics. Было обнаружено большое количество микроРНК, которые значимо положительно коррелируют с *PTEN* (темно-красные точки), и которые значимо отрицательно коррелируют с *PTEN* (темно-зеленые точки) (FDR < 0,01) (Рисунок 59).



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

Рисунок 59 – Уровни экспрессии микроРНК-3200, -577, -301а, -877, -3942 в опухолевых тканях плоскоклеточного рака легкого в зависимости от статуса курения пациентов

Далее, *in silico* анализ с помощью TargetScan позволил нам идентифицировать набор микроРНК, нацеленных на PTEN. Наибольший интерес у нас вызвала микроРНК-301a-3p, поскольку у нее значение context++ score percentile составляет 90 %. Взаимосвязь уровня экспрессии этой микроРНК и PTEN был изучен на наших образцах ПКРЛ.

3.6 Характеристика опухолевых образцов пациентов с немелкоклеточным раком легкого по уровню экспрессии *AhR*, *CYP1A1*, *AhR*-регулируемых микроРНК в зависимости от статуса курения и PD-L1

*Оценка уровня экспрессии *AhR* в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ*

В нашем исследовании мы провели анализ уровня экспрессии гена *AhR* в образцах опухолей разных подтипов НМРЛ в зависимости от статуса курения (Таблица 27).

Таблица 27 – Относительные уровни мРНК *AhR* в образцах тканей пациентов с немелкоклеточным раком легкого в зависимости от подтипа и статуса курения

| N (число пациентов) | мРНК <i>AhR</i> * | 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. | | |

Результаты показали, что экспрессия мРНК *AhR* была различная во всех трех группах. У пациентов с ПКРЛ уровень мРНК *AhR* повышен в 1,5 раза по сравнению с условно-нормальной тканью, тогда как у пациентов курильщиков с АКЛ уровень мРНК *AhR* в 1,5 раза снижался. У некурящих пациентов с АКЛ

уровень экспрессии не менялся (Таблица 27). Нужно отметить, что полученные данные по уровню экспрессии *AhR* не достигли статистической достоверности.

Оценка уровня экспрессии CYP 1A1 в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ

Нами был определен уровень экспрессии ключевого гена-мишени *AhR CYP1A1* в исследуемых образцах НМРЛ. Как видно из Таблицы 28, среди опухолевых образцов ПКРЛ в 53 % случаев в опухоли и в условно-нормальной ткани легкого отсутствовала экспрессия *CYP1A1*. В остальных случаях ПКРЛ регистрируется экспрессия *CYP1A1* преимущественно в образцах опухолевой ткани (46 %).

Таблица 28 – Распределение пациентов в зависимости от наличия экспрессии *CYP1A1*

| Гистотип и статус курения | Экспрессия <i>CYP1A1</i> отсутствует в нормальной и опухолевой ткани | Положительная экспрессия* | |
|---------------------------|--|--|--|
| | | Экспрессия <i>CYP1A1</i> присутствует в нормальной ткани | Экспрессия <i>CYP1A1</i> присутствует в опухолевой ткани |
| ПКРЛ курильщики | 53,330 % | 13,330 % | 46,670 % |
| АКЛ некурящие | 77,780 % | 22,220 % | 0,000 % |
| АКЛ курильщики | 26,320 % | 63,160 % | 42,110 % |

Примечание: * – экспрессия считалась положительной при Ct от 22 до 37.

Для АКЛ некурящих пациентов экспрессия *CYP1A1* практически не регистрировалась, и только в 22 % случаев она наблюдалась в условно-нормальной ткани. Для пациентов курильщиков с АКЛ, напротив, наблюдался повышенный уровень экспрессии *CYP1A1* как в условно-нормальной ткани легкого, так и в образцах опухолевой ткани (63 % и 42 % соответственно) (см. таблицу 28).

Далее были выделены группы, разделенные по уровню экспрессии *CYP1A1*, и проанализирована взаимосвязь с уровнем экспрессии *AhR* (Таблица 29).

1) Экспрессия *CYP1A1* отсутствует в опухолевой и условно-нормальной ткани (контрольная группа).

- 2) Экспрессия *CYP1A1* присутствует в условно-нормальной ткани.
- 3) Экспрессия *CYP1A1* присутствует в опухолевой ткани.

В результате было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии *AhR* почти в 12 раз в образцах опухоли ПКРЛ при наличии экспрессии *CYP1A1*. В других группах достоверной взаимосвязи выявлено не было.

Таблица 29 – Связь экспрессии *AhR* с наличием экспрессии *CYP1A1* в тканях пациентов с немелкоклеточным раком легкого

| Гистотип и статус курения | M.** <i>AhR</i> | | |
|---------------------------|---|--|--|
| | Экспрессия <i>CYP1A1</i> отсутствует в нормальной и опухолевой ткани (контрольная группа) | Положительная экспрессия (Ct 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 (M. = медиана) различий в уровнях мРНК *AhR* между тканями НМРЛ и образцами нормальной ткани, результат был нормирован к уровню мРНК в условно-нормальной ткани.

Оценка уровня экспрессии микроРНК в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ

Мы изучили уровень экспрессии отобранных ранее *AhR*-зависимых микроРНК-21, -342, -93, -181a, -146a и PD-L1, регулирующих микроРНК-155, -18a, -146a в опухолевых образцах исследуемых подгрупп пациентов (Таблицы 30, 31 и 32).

Таблица 30 – Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181а, -155, -146а 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 31 – 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). | | | | | | |

Таблица 32 – Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181а, -155, -146а в образцах тканей пациентов с аденокарциномой легкого некурильщики (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). | | | | | | |

Как видно из таблицы 30 в опухолевых образцах пациентов с ПКРЛ уровень экспрессии AhR-зависимых микроРНК-342 и микроРНК-181a значительно снижался (в 3 раза) по сравнению с нормальной (прилегающей) тканью легкого. В свою очередь в опухолевых образцах пациентов с АКЛ уровень экспрессии исследуемых микроРНК менялся по-разному в зависимости от курения. Так уровень экспрессии AhR-зависимых микроРНК-21, -93 и PD-L1, регулирующей микроРНК-155, повышался у курильщиков в 2; 1,6 и 1,5 раза соответственно, а уровень экспрессии AhR-зависимых микроРНК-342, -181a снижался у этой группы пациентов в 2 и 1,5 раза соответственно (см. таблицу 31). В образцах опухолевой ткани пациентов с АКЛ некурящих наблюдалась несколько иная картина: уровень экспрессии AhR-зависимой микроРНК-21 возрастал в 4 раза, AhR-зависимой микроРНК-93 и PD-L1, регулирующей микроРНК-155, возрастал почти в 3 раза, тогда как достоверных изменений в уровне экспрессии AhR-зависимых микроРНК-181a, -146a, -342 не выявлено (см. таблицу 32).

Оценка уровня экспрессии микроРНК в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ в зависимости от уровня экспрессии AhR

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) (Таблица 33).

Таблица 33 – Относительные уровни экспрессии микроРНК-21, -342, -93, -181a, -155, -146a в образцах тканей немелкоклеточного рака легкого (медиана и диапазон относительного изменения уровней микроРНК в опухолевой ткани по сравнению с парной условно-нормальной тканью) в зависимости от уровня экспрессии AhR (miR – микроРНК)

| miRs | Низкая экспрессия AhR ($< M_{AhR}$) | | | Высокая экспрессия AhR ($\geq M_{AhR}$) | | | $\geq M_{AhR}/< M_{AhR}$ |
|--|---------------------------------------|-------|-------|---|-------|--------|--------------------------|
| | мед. | мин. | макс. | мед. | мин. | макс. | |
| Плоскоклеточный рак легкого (курильщики) | | | | | | | |
| miR-21 | 1,743 | 0,091 | 5,035 | 1,228 | 0,015 | 11,652 | 0,705 |
| miR-342 | 0,831 | 0,012 | 1,261 | 0,242 | 0,001 | 2,626 | 0,291 |

Продолжение таблицы 33

| miRs | Низкая экспрессия <i>AhR</i> ($< M_{AhR}$) | | | Высокая экспрессия <i>AhR</i> ($\geq M_{AhR}$) | | | $\geq M_{AhR} / < M_{AhR}$ |
|--|--|-------|-------|--|-------|--------|----------------------------|
| | мед. | мин. | макс. | мед. | мин. | макс. | |
| Плоскоклеточный рак легкого (курильщики) | | | | | | | |
| miR-93 | 4,161* | 1,435 | 6,364 | 0,775* | 0,112 | 3,933 | 0,186 |
| miR-181a | 0,400 | 0,186 | 1,184 | 0,262 | 0,003 | 2,778 | 0,655 |
| miR-155 | 1,008 | 0,007 | 5,957 | 1,321 | 0,013 | 6,477 | 1,311 |
| miR-146a | 0,664 | 0,277 | 1,035 | 0,225 | 0,098 | 4,790 | 0,339 |
| Аденокарцинома (курильщики) | | | | | | | |
| miR-21 | 1,679* | 0,173 | 4,111 | 3,938* | 0,854 | 14,005 | 2,345 |
| miR-342 | 0,339* | 0,055 | 0,610 | 0,667* | 0,266 | 1,373 | 1,968 |
| miR-93 | 0,815 | 0,231 | 4,558 | 1,790 | 0,366 | 7,952 | 2,196 |
| miR-181a | 0,284 | 0,092 | 1,972 | 0,711 | 0,401 | 1,775 | 2,504 |
| miR-155 | 0,936* | 0,295 | 3,792 | 1,977* | 0,802 | 12,406 | 2,112 |
| miR-146a | 0,708 | 0,085 | 1,606 | 1,235 | 0,602 | 2,954 | 1,744 |
| Аденокарцинома (некурящие) | | | | | | | |
| miR-21 | 4,061 | 3,508 | 8,385 | 6,771 | 1,953 | 8,280 | 1,667 |
| miR-342 | 1,629* | 0,834 | 4,469 | 0,664* | 0,122 | 1,553 | 0,408 |
| miR-93 | 3,382 | 1,813 | 3,702 | 1,740 | 0,332 | 4,315 | 0,514 |
| miR-181a | 0,991 | 0,444 | 2,003 | 0,860 | 0,404 | 2,196 | 0,868 |
| miR-155 | 4,628* | 2,757 | 6,279 | 1,220* | 0,495 | 4,549 | 0,264 |
| miR-146a | 1,122 | 0,622 | 6,564 | 1,327 | 0,278 | 2,419 | 1,183 |
| Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$). | | | | | | | |

Данный анализ показал, что у курящих пациентов с ПКРЛ в опухолевых образцах с высокой экспрессией *AhR* уровень экспрессии *AhR*-зависимой микроРНК-93 снижался в 5,4 раза по сравнению с опухолевыми образцами с низкой экспрессией *AhR*. В опухолевых образцах пациентов с АКЛ курильщиков уровень экспрессии *AhR*-зависимых микроРНК-21, -342, и PD-L1, регулирующей микроРНК-155, достоверно увеличивался в 2 раза при высокой экспрессии *AhR*. В опухолевых образцах некурящих пациентов с АКЛ, напротив, экспрессия *AhR*-зависимой микроРНК-342 и PD-L1, регулирующей микроРНК-155,

снижалась при высокой экспрессии *AhR* в 2,5 и 4 раза соответственно.

Оценка связи уровня микроРНК с клинико-паталогическими параметрами у пациентов с ПКРЛ

Для оценки отобраны следующие параметры:

- а) возраст, так как медианное значение возраста в выборке было 67 лет, то пациентов разделили на группу младше < 67 лет и > 67 лет;
- б) размер опухоли ≤ 2 см и больше 2 см;
- в) метастатическое поражение регионарных л/узлов N0 или N+

Распределение пациентов по клинико-патологическим параметрам и оценка взаимосвязи их с отобранными микроРНК представлено в таблицах 34, 35 и 36.

Таблица 34 – Клинико-патологические характеристики пациентов с плоскоклеточным раком легкого курильщиков

| Клинико-патологические характеристики | Значения клинико-патологических характеристик | Размер группы, шт. |
|---------------------------------------|---|--------------------|
| Возраст | < 67* | 19 |
| | ≥ 67 | 21 |
| Т стадия | T1 | 10 |
| | T2 | 21 |
| | T3 | 6 |
| | T4 | 3 |
| N стадия | N0 | 24 |
| | N1 | 14 |
| | N2 | 2 |
| | N3 | 0 |
| Примечание: * – медианное значение. | | |

Таблица 35 – Ассоциация уровней экспрессии AhR-зависимых микроРНК-21, -342, -93 с клинико-патологическими характеристиками образцов ткани плоскоклеточного рака легкого курильщиков

| Клинико-патологические характеристики | Значения клинико-патологических характеристик | Относительный уровень микроРНК | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | miR-21 | miR-342 | miR-93 |
| | | медиана (диапазон значений) | медиана (диапазон значений) | медиана (диапазон значений) |
| Возраст | < 67 | 1,62 (0,09–11,65) | 0,43 (0,01–2,58) | 4,25* (0,11–10,02) |
| | ≥ 67 | 0,85 (0,02–10,01) | 0,24 (0,01–2,63) | 1,39* (0,02–4,98) |
| Т-стадия | T1 | 1,22 (0,11–11,65) | 0,47 (0,04–2,58) | 2,87 (1,35–4,98) |
| | T2–T4 | 1,47 (0,02–6,24) | 0,21 (0,01–2,62) | 0,82 (0,02–10,02) |
| N-стадия | N0 | 1,58 (0,02–11,65) | 0,33 (0,01–2,58) | 2,11 (0,04–10,02) |
| | N1–N3 | 0,61 (0,09–5,43) | 0,17 (0,01–2,63) | 0,78 (0,02–6,31) |

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

Таблица 36 – Ассоциация уровней экспрессии AhR-зависимых микроРНК-181a, -146a и PD-L1, регулирующей микроРНК-155, с клинико-патологическими характеристиками образцов тканей плоскоклеточного рака легкого курильщиков

| Клинико-патологические характеристики | Значения клинико-патологических характеристик | Относительный уровень микроРНК | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | miR-181a | miR-155 | miR-146a |
| | | медиана (диапазон значений) | медиана (диапазон значений) | медиана (диапазон значений) |
| Возраст | < 67 | 0,37 (0,03–2,90) | 2,43 (0,01–13,24) | 1,64 (0,09–8,57) |
| | ≥ 67 | 0,32 (0,01–1,25) | 1,37 (0,01–11,80) | 0,49 (0,01–4,79) |

Продолжение таблицы 36

| Клинико-патологические характеристики | Значения клинико-патологических характеристик | Относительный уровень микроРНК | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | miR-181a | miR-155 | miR-146a |
| | | медиана (диапазон значений) | медиана (диапазон значений) | медиана (диапазон значений) |
| Т-стадия | T1 | 0,60* (0,10–2,78) | 4,25* (1,06–6,48) | 1,95 (0,18–8,57) |
| | T2–T4 | 0,29* (0,01 – 2,90) | 1,01* (0,01–13,24) | 0,41 (0,01–8,56) |
| N-стадия | N0 | 0,43* (0,01–2,90) | 2,16* (0,01–13,24) | 2,86 (0,01–8,57) |
| | N1–N3 | 0,19* (0,01–1,18) | 0,78* (0,04–5,56) | 0,31 (0,01–4,79) |

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

Была обнаружена связь экспрессии AhR-регулируемой микроРНК-93 с возрастом пациентов с ПКРЛ, уровень данной микроРНК был снижен в 3 раза у пациентов старше 67 лет. Для PD-L1-регулирующей и AhR-зависимой микроРНК-181a было показано достоверное снижение ее уровня при увеличении размера опухоли в 2 раза. Уровень AhR-зависимой, PD-L1-регулирующей микроРНК-181a и PD-L1-регулирующей микроРНК-155 был достоверно снижен в образцах опухоли пациентов с метастазами в лимфатических узлах по сравнению со случаями без метастазов в 2 и в 3 раза соответственно.

Исследование ассоциации уровня экспрессии AhR-регулируемых микроРНК со статусом PD-L1 в опухолевых образцах курящих пациентов с НМРЛ

Согласно современным данным PD-L1 может являться одной из мишеней AhR; таким образом, мы исследовали ассоциацию уровня экспрессии AhR-регулируемых микроРНК с различным уровнем PD-L1 в опухолевых образцах, определенным методом ИГХ (Таблица 37).

Таблица 37 – Уровень TPS в разных гистологических подтипах немелкоклеточного рака легкого в зависимости от статуса курения

| Значение TPS (%) | ПКРЛ курильщики (n = 40) | | АКЛ курильщики (n = 40) | | АКЛ некурящие (n = 40) | |
|--------------------|-----------------------------|----|----------------------------|----|---------------------------|----|
| | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| < 1 | 18 | 46 | 20 | 50 | 30 | 75 |
| 1–49 | 13 | 32 | 16 | 41 | 6 | 15 |
| ≥50 | 9 | 22 | 4 | 9 | 4 | 10 |

Примечание: TPS – соотношения опухолевых клеток с позитивным окрашиванием мембраны к общему количеству опухолевых клеток.

В исследование взяты образцы опухолей только курящих пациентов с ПКРЛ и АКЛ, так как частота выявления экспрессии PD-L1 в этих образцах выше. Более того опухолевые образцы разделены на 3 группы в зависимости от уровня TPS: 1 группа TPS < 1 % (PD-L1 0), 2 группа TPS от 1 % до 49 % включительно (PD-L1–) и 3 группа TPS от 50 % до 100 % (PD-L1+). PD-L1 TPS < 1 % считался отрицательным, данные представлены в таблицах 38 и 39.

Таблица 38 – Ассоциация уровней экспрессии микроРНК-21, -342, -243, -181а, -155, -146а со статусом PD-L1 (0 %, 1–49 % и 50–100 %) у курящих пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого (miR – микроРНК)

| микроРНК | PD-L1- статус (%) | Медианное значение | Диапазон | | р-значение | | |
|----------|-------------------------|-----------------------|----------|-------|----------------------------|----------|-------------|
| | | | min | max | соотношение уровня TPS (%) | | |
| | | | | | 0/1–49 | 0/50–100 | 1–49/50–100 |
| miR-21 | 0 | 0,764 | 0,015 | 4,656 | 0,665 | 0,368 | 0,205 |
| | 1–49 | 1,349 | 0,089 | 5,431 | | | |
| | 50–100 | 0,945 | 0,091 | 1,743 | | | |
| miR-342 | 0 | 0,150 | 0,011 | 1,261 | 0,426 | 0,559 | 0,104 |
| | 1–49 | 0,498 | 0,021 | 1,242 | | | |
| | 50–100 | 0,203 | 0,012 | 0,539 | | | |

Продолжение таблицы 38

| микроРНК К | PD-L1- статус (%) | Медианное значение | Диапазон | | р-значение | | |
|---------------|----------------------|-----------------------|----------|-------|----------------------------|----------|-------------|
| | | | min | max | Соотношение уровня TPS (%) | | |
| | | | | | 0/1-49 | 0/50-100 | 1-49/50-100 |
| miR-93 | 0 | 0,98 | 0,04 | 4,25 | 0,714 | 0,034* | 0,020* |
| | 1-49 | 0,82 | 0,18 | 6,31 | | | |
| | 50-100 | 4,07 | 1,80 | 6,36 | | | |
| miR-181a | 0 | 0,104 | 0,003 | 1,089 | 0,049* | 0,345 | 0,632 |
| | 1-49 | 0,209 | 0,026 | 0,369 | | | |
| | 50-100 | 0,293 | 0,285 | 0,432 | | | |
| miR-155 | 0 | 0,473 | 0,013 | 1,587 | 0,466 | 0,019* | 0,250 |
| | 1-49 | 2,264 | 0,349 | 5,561 | | | |
| | 50-100 | 5,957 | 2,486 | 6,477 | | | |
| miR-146a | 0 | 0,23 | 0,00 | 1,04 | 0,051 | 0,213 | 0,531 |
| | 1-49 | 2,12 | 0,10 | 4,79 | | | |
| | 50-100 | 0,66 | 0,18 | 8,57 | | | |

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

Как видно из таблицы 38 уровень экспрессии AhR-зависимой микроРНК-93 возрастал в 4 раза в образцах опухолевой ткани ПКРЛ с высокой экспрессией PD-L1 (> 50 %), и в 5 раз – в образцах опухолевой ткани с промежуточным уровнем экспрессии PD-L1 (1-49 %) по сравнению с образцами опухоли без экспрессии PD-L1 (0 %). Аналогичные изменения были выявлены в уровне экспрессии PD-L1, регулирующей микроРНК-155, увеличение более чем в 10 раз в образцах опухолевой ткани ПКРЛ с высокой экспрессией PD-L1 (> 50 %) и увеличение в 2 раза для AhR-зависимой, PD-L1-регулирующей микроРНК-181a в опухолевых образцах с промежуточным уровнем экспрессии PD-L1 (1-49 %).

Таблица 39 – Ассоциация уровней экспрессии микроРНК-21, -342, -243, -181а, -155, -146а со статусом PD-L1 (0 %, 1–49 % и 50–100 %) у курящих пациентов с диагнозом аденокарцинома легкого (miR – микроРНК)

| микроРНК | PD-L1-статус (%) | Медианное значение | Диапазон | | р-значение | | |
|----------|------------------|--------------------|----------|--------|----------------------------|----------|-------------|
| | | | min | max | соотношение уровня TPS (%) | | |
| | | | | | 0/1–49 | 0/50–100 | 1–49/50–100 |
| miR-21 | 0 | 1,821 | 0,465 | 12,309 | 0,856 | 0,029* | 0,023* |
| | 1-49 | 1,961 | 0,174 | 6,370 | | | |
| | 50-100 | 10,804 | 7,602 | 14,006 | | | |
| miR-342 | 0 | 0,513 | 0,162 | 1,369 | 0,074 | 0,064 | 0,028* |
| | 1-49 | 0,230 | 0,055 | 0,599 | | | |
| | 50-100 | 0,686 | 0,668 | 0,704 | | | |
| miR-93 | 0 | 1,031 | 0,366 | 7,797 | 0,965 | 0,205 | 0,171 |
| | 1-49 | 0,930 | 0,231 | 7,948 | | | |
| | 50-100 | 2,458 | 1,564 | 3,353 | | | |
| miR-181a | 0 | 0,555 | 0,166 | 1,970 | 0,277 | 0,673 | 0,254 |
| | 1-49 | 0,320 | 0,092 | 1,767 | | | |
| | 50-100 | 0,922 | 0,401 | 1,442 | | | |
| miR-155 | 0 | 1,564 | 0,294 | 3,792 | 0,651 | 0,933 | 0,649 |
| | 1-49 | 1,288 | 0,446 | 12,400 | | | |
| | 50-100 | 1,895 | 0,800 | 2,990 | | | |
| miR-146a | 0 | 0,963 | 0,255 | 2,614 | 0,587 | 0,035* | 0,068 |
| | 1-49 | 1,136 | 0,085 | 2,689 | | | |
| | 50-100 | 2,471 | 1,989 | 2,954 | | | |

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

Согласно таблице 39 уровень экспрессии AhR-зависимой микроРНК-21 возрастал почти в 6 раз в образцах опухолевой ткани АКЛ с высокой и промежуточной экспрессией PD-L1 (> 50 % и 1–49 %). Кроме того, получено достоверное повышение экспрессии AhR-зависимой микроРНК-146а в 2 раза для образцов опухоли с высокой экспрессией PD-L1 (> 50 %), и в 3 раза – AhR-зависимой микроРНК-342 для образцов опухоли с промежуточным

значением экспрессии PD-L1 (1–49 %). Для других исследуемых микроРНК достоверных различий в экспрессии не выявлено.

3.7 Исследование экспрессии гена *PTEN* в опухолевых образцах немелкоклеточного рака легкого

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 (Таблица 40).

Таблица 40 – 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. | | |

Как видно из таблицы 40 уровень экспрессии гена *PTEN* существенно снижен 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 достоверности.

Исследование экспрессии PTEN в зависимости от уровня экспрессии AhR и микроРНК

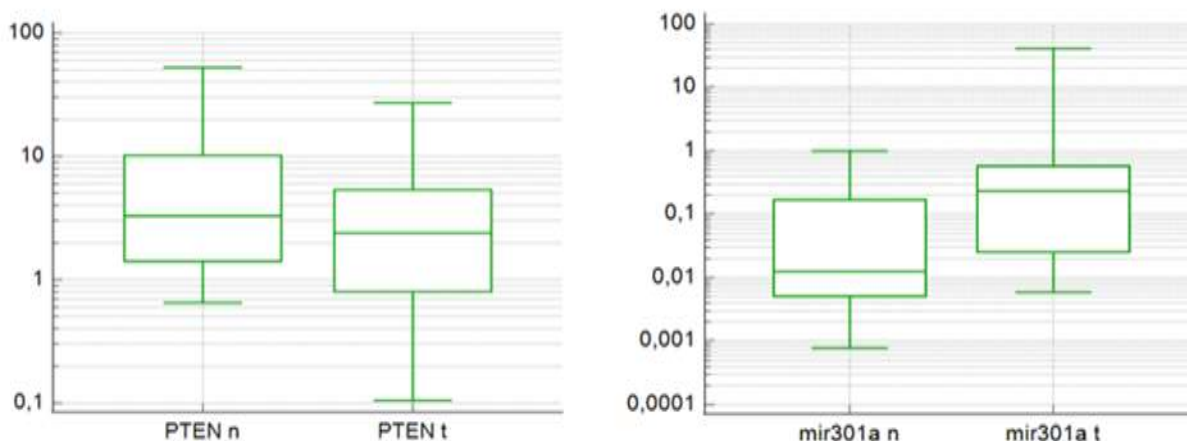
В нашей работе мы изучили экспрессию *PTEN* в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ в зависимости от уровня экспрессии *AhR* (деление проводили по медианному значению) (Таблица 41).

Таблица 41 – 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 ($p < 0,01$). | | | | | | |

Результаты показали 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).

Далее мы исследовали изменение уровня экспрессии отобранной ранее микроРНК-301a и гена *PTEN* в опухолевых образцах пациентов с ПКРЛ курильщиков (Рисунок 61).



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

Рисунок 61 – 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

Результаты показали значимое снижение медианного значения уровня экспрессии *PTEN* в опухоли в 1,37 раза по сравнению с прилежащей нормальной тканью ($p = 0,047$). В свою очередь, при анализе в этих же образцах уровня микроРНК-301а было обнаружено значимое увеличение медианы в 19 раз в опухолевой ткани ($p = 0,0013$) (см. рисунок 61).

Мы также обнаружили отрицательную корреляцию между относительными уровнями мРНК *PTEN* и микроРНК-301а в опухолевой ткани с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена ($-0,573$, $p < 0,0001$) (Рисунок 62).

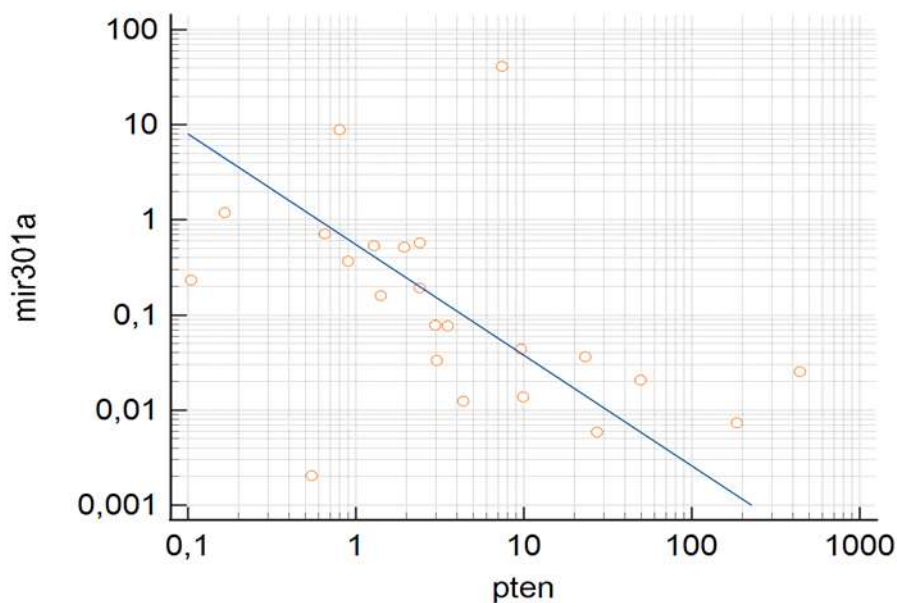


Рисунок 62 – Корреляция относительных уровней мРНК *PTEN* и микроРНК-301а в опухолевых образцах пациентов курильщиков с плоскоклеточным раком легкого

В работе также была изучена корреляция AhR-регулируемых микроРНК-21, -93, -181, -155 и PD-L1, регулирующей микроРНК-155, с уровнем экспрессии гена *PTEN* в опухолевых образцах НМРЛ (Таблица 42).

Таблица 42 – Корреляция экспрессии исследуемых микроРНК с уровнем мРНК *PTEN* в опухолевых образцах немелкоклеточного рака легкого (медиана и диапазон относительного изменения уровня микроРНК и мРНК в опухоли по сравнению с парной условно-нормальной тканью)

| МикроРНК | Низкая экспрессия <i>PTEN</i> ($< M^{**}_{PTEN}$) | Высокая экспрессия <i>PTEN</i> ($\geq M_{PTEN}$) | r_s^{***} |
|--|--|---|-------------|
| | Медиана (диапазон) | Медиана (диапазон) | |
| Плоскоклеточный рак легкого (курильщики) | | | |
| miR-21 | 1,58 (0,09–5,04) | 1,55 (0,02–11,65) | -0,132 |
| miR-342 | 0,60 (0,01–1,26) | 0,23 (0,01–2,63) | 0,011 |
| miR-93 | 1,63 (0,12–6,36) | 1,60 (0,11–6,31) | -0,240 |

Продолжение таблицы 42

| МикроРНК | Низкая экспрессия <i>PTEN</i> ($< M^{**}_{PTEN}$) | Высокая экспрессия <i>PTEN</i> ($\geq M_{PTEN}$) | r_s^{***} |
|---|--|---|-------------|
| | Медиана (диапазон) | Медиана (диапазон) | |
| Плоскоклеточный рак легкого (курильщики) | | | |
| miR-181a | 0,43 (0,10–1,18) | 0,26 (0,01–2,78) | –0,165 |
| miR-155 | 0,96 (0,01–1,59) | 3,07 (0,01–6,48) | 0,591 |
| miR-146a | 0,66 (0,18–1,04) | 0,53 (0,10–46,18) | –0,022 |
| Аденокарцинома (курильщики) | | | |
| miR-21 | 2,96 (0,94–57,72) | 1,74 (0,22–56,78) | –0,354 |
| miR-342 | 0,30 (0,06–0,61) * | 0,66 (0,27–1,37) * | 0,792 |
| miR-93 | 0,48 (0,23–2,03)* | 1,82 (0,62–7,95)* | 0,505 |
| miR-181a | 0,36 (0,09–1,97) | 0,79 (0,31–1,52) | 0,499 |
| miR-155 | 0,97 (0,29–3,79) | 1,46 (0,80–12,40) | 0,327 |
| miR-146a | 0,65 (0,09–1,61)* | 1,16 (0,60–2,95)* | 0,633 |
| Аденокарцинома (некурящие) | | | |
| miR-21 | 4,06 (3,51–8,39) | 6,77 (1,95–8,28) | –0,212 |
| miR-342 | 1,63 (0,83–4,47)* | 0,66 (0,12–1,55)* | –0,588 |
| miR-93 | 3,38 (1,81–3,70) | 1,74 (0,33–4,32) | –0,310 |
| miR-181a | 0,99 (0,44–2,00) | 0,86 (0,40–2,20) | –0,139 |
| miR-155 | 4,63 (2,76–6,28)* | 0,88 (0,50–2,08)* | –0,762 |
| miR-146a | 1,12 (0,62–6,56) | 1,33 (0,28–2,42) | –0,139 |
| Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – M = медианное значение относительного уровня мРНК <i>PTEN</i> ; *** – коэффициент корреляции Спирмена между уровнем микроРНК и уровнем мРНК <i>PTEN</i> . | | | |

Результаты показали, что только PD-L1-регулирующая микроРНК-155, имела достоверную отрицательную корреляцию с *PTEN* в опухолевых образцах некурящих пациентов с АКЛ (–0,761, $p = 0,03$). Тогда как AhR-зависимая микроРНК-93 геном-мишенью которых является *PTEN* демонстрировала достоверную положительную корреляцию с уровнем мРНК *PTEN* у пациентов курильщиков с АКЛ (0,505; $p = 0,028$).

Оценка взаимосвязи уровня экспрессии AhR и PTEN с уровнем PD-L1 у пациентов курильщиков с НМРЛ

Для пациентов с ПКРЛ было показано достоверное снижение в 4 раза уровня экспрессии *AhR* в группе пациентов с умеренной экспрессией PD-L1 (TPS 1–49 %) по сравнению с группой пациентов, у которых экспрессия отсутствует (TPS 0 %). Для уровня экспрессии *PTEN* достоверной взаимосвязи выявлено не было (Таблица 43).

Таблица 43 – 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 | | |
|-------------|------------------|--------------------|----------|--------|----------------------------|----------|-------------|
| | | | | | Соотношение уровня TPS (%) | | |
| | | | min | max | 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 ($p < 0,05$).

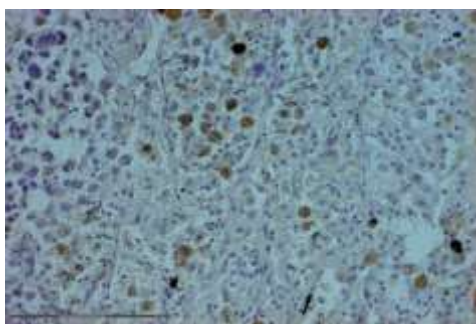
У пациентов курильщиков с АКЛ выявлено достоверное снижение в 4 раза уровня экспрессии *PTEN* в группе с умеренной экспрессией PD-L1 (TPS 1-49 %), тогда как уровень экспрессии *AhR* достоверно повышался в 13 раз в группе пациентов с высокой экспрессией PD-L1 (TPS > 50 %) (Таблица 44).

Таблица 44 – 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

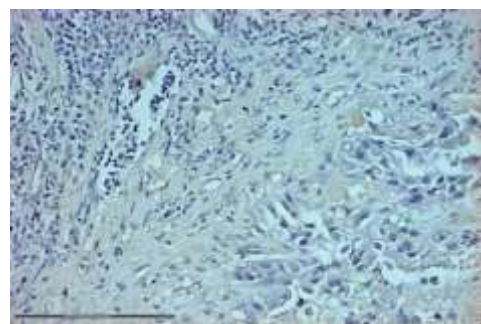
| мРНК | PD-L1-статус (%) | Медианное значение | Диапазон | | р-значение | | |
|-------------|------------------|--------------------|----------|--------|----------------------------|----------|-------------|
| | | | | | Соотношение уровня TPS (%) | | |
| | | | min | max | 0/1–49 | 0/50–100 | 1–49/50–100 |
| <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 ($p < 0,05$).

С учетом того, что пост-транскрипционные изменения *PTEN* могут быть разнообразны, в нашей работе мы сопоставили уровень белка *PTEN* на нескольких образцах опухолевой ткани, определенный иммуногистохимическим методом (ИГХ) или иммунофлюоресцентным анализом (ИФА), с уровнем мРНК *PTEN*, а также определили взаимосвязь белка *PTEN* с уровнем экспрессии PD-L1 для пациентов курильщиков с ПКРЛ (Рисунки 63 и 64).



а



б

Рисунок 63 – Данные иммуногистохимического исследования опухолевой ткани немелкоклеточного рака легкого: а) – *PTEN*+++ , уровень мРНК *PTEN* 1,493; б) – *PTEN*- , уровень мРНК *PTEN* 0,091 (медиана и диапазон относительного изменения уровней мРНК в опухоли легкого по сравнению с условно-нормальной тканью)

На отобранных образцах опухолевой ткани НМРЛ мы получили сопоставимые результаты уровня белка PTEN и уровня мРНК *PTEN*.

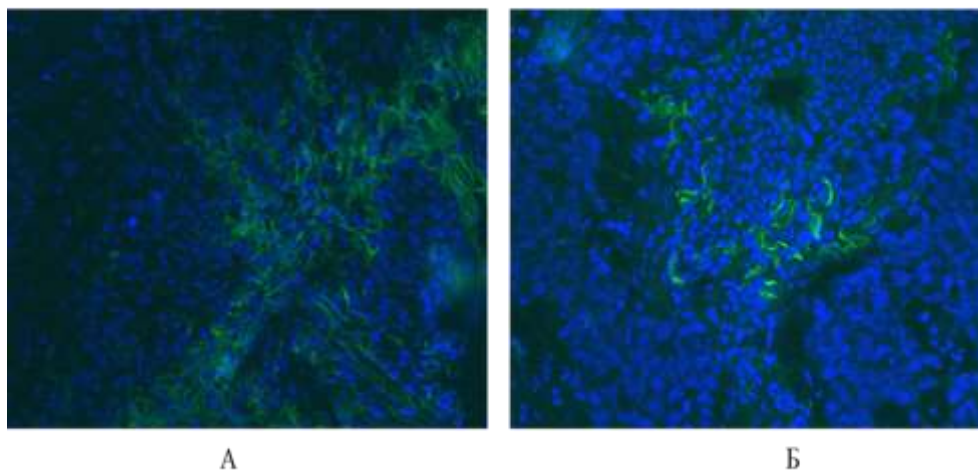


Рисунок 64 – Иммунофлюоресцентный анализ PTEN в опухолевой ткани плоскоклеточного рака легкого с низким уровнем PD-L1 (А) и высоким (Б), соответственно

Таблица 45 – Интенсивность флюоресцентного сигнала в опухолевой ткани плоскоклеточного рака легкого курильщиков в зависимости от экспрессии PD-L1

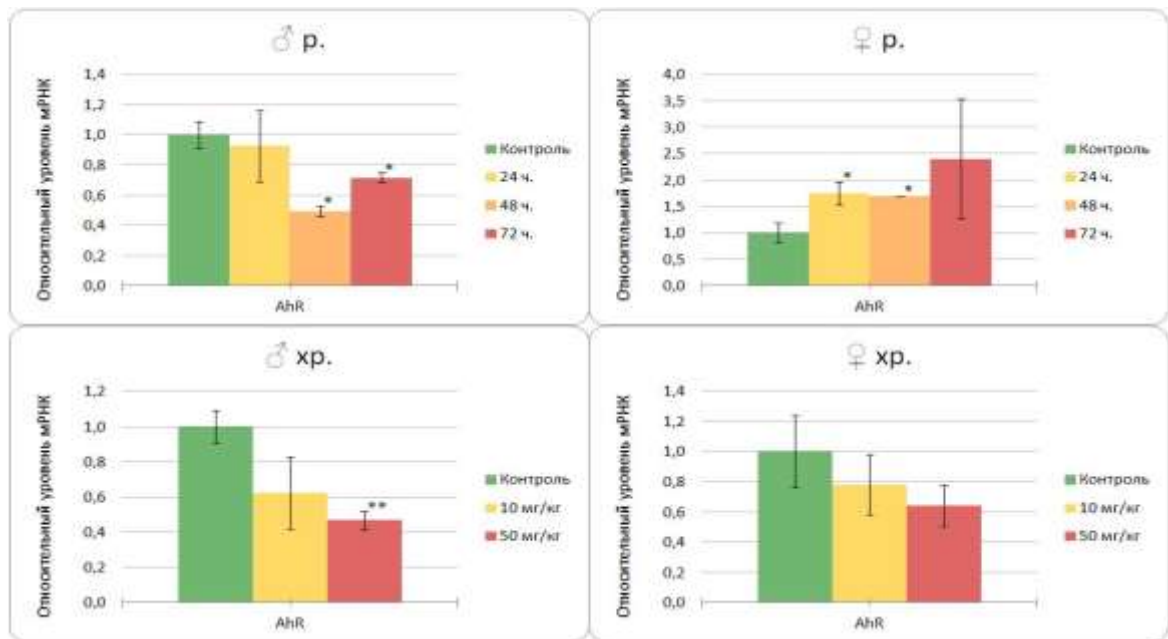
| Показатель | ПКРЛ (PD-L1 < 50 %), %/шт. ядер | ПКРЛ (PD-L1 ≥ 50 %), %/шт. ядер | f_{PTEN} |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|------------|
| f_{PTEN} | $0,273 \pm 0,002$ | $0,121 \pm 0,001$ | 0,44 |

Статистической значимости в различии между опухолевой тканью с высоким и низким уровнем PD-L1 выявлено не было, однако была выявлена тенденция к снижению уровня PTEN в тканях ПКРЛ для образцов с высоким уровнем PD-L1 (см. таблицу 45, см. рисунок 63).

3.8 Исследование эффектов бензо(а)пирена на экспрессию *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AhR*, *AhR*-зависимых микроРНК и их генов-мишеней в легких самцов и самок крыс

Экспериментальное влияние бензо(а)пирена на экспрессию AhR (животные)

При изучении влияния бензо(а)пирена (БП) на экспрессию *AhR* были получены различающиеся результаты для самцов и самок крыс (Рисунок 65).



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.

Рисунок 65 – Относительный уровень экспрессии гена *AhR* в легких крыс Вистар Вистар, инкубированных с 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 ($n = 4$); ♂ xp. – хроническое введение бензо(а)пирена (12 недель, с периодичностью 1 раз в неделю) самцам крыс Вистар ($n = 4$); ♀ xp. – хроническое введение бензо(а)пирена (12 недель, с периодичностью 1 раз в неделю) самкам крыс Вистар ($n = 4$)

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.

Экспериментальное влияние бензо(а)пирена на экспрессию классических генов-мишеней AhR (животные)

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 (Таблицы 46 и 47, Рисунок 66).

Таблица 46 – 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)

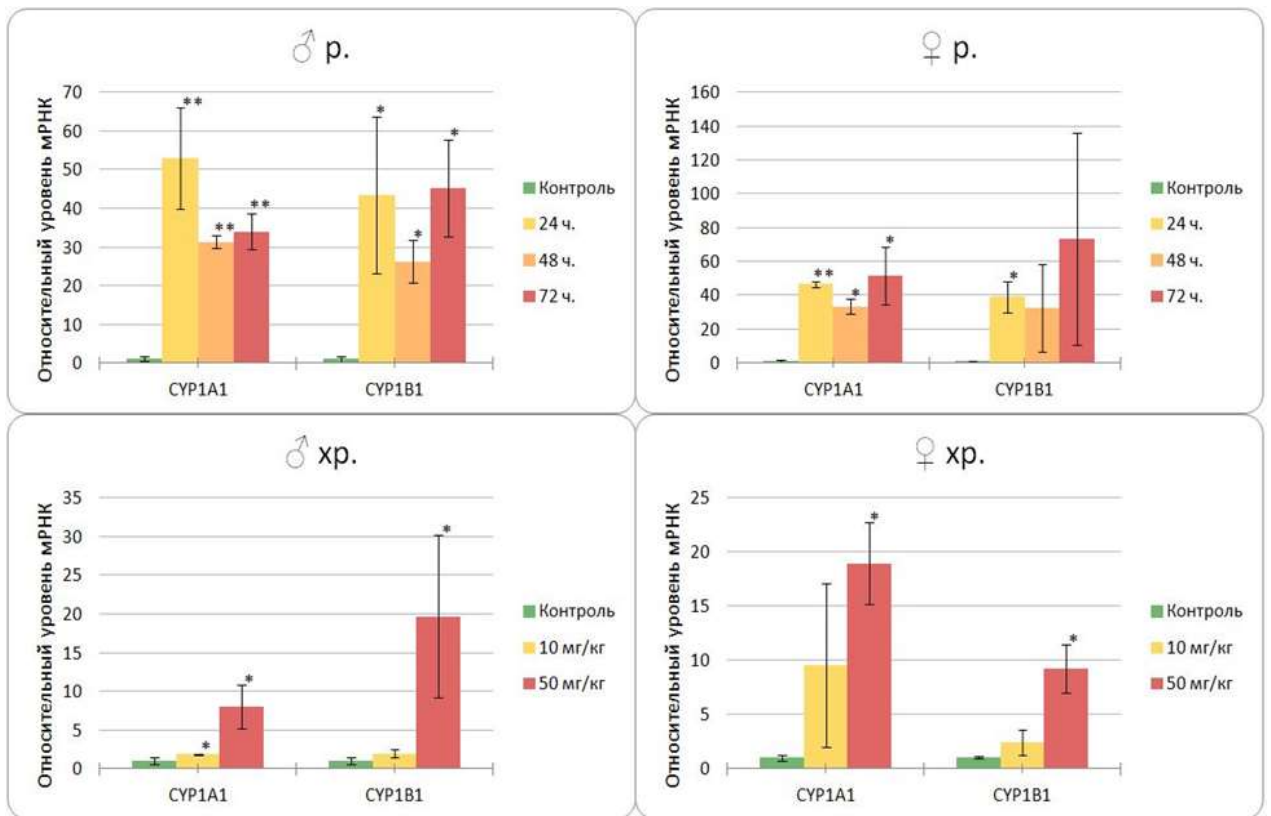
| мРНК | Однократное введение БП (75 мг/кг) | | | | | | | |
|----------------|------------------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | ♂ | | | | ♀ | | | |
| | контроль | 24 часа | 48 часов | 72 часа | контроль | 24 часа | 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.

Таблица 47 – 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.



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.

Рисунок 66 – Относительный уровень экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1* в легких крыс Вистар, инкубированных с 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 ($n = 4$)

Однократное введение БП приводило к повышению экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* в легких самцов и самок крыс во всех исследуемых группах в 26–73 раза. Хроническое введение БП дозой 10 мг/кг также приводило к повышению экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1* в 1,8–9,5 раза, в то время как введение БП дозой 50 мг/кг – в 7,9–19,0 раз. Однако, при хроническом введении БП повышение

экспрессии происходило в среднем в 5 раз слабее, чем при остром. Сравнивая уровни экспрессии у особей разных полов, мы обнаружили, что экспрессия *CYP1A1* в легких самок в среднем в 1,5–2,0 раза выше, чем у самцов для всех экспериментальных групп.

Влияние однократного введения бензо(а)пирена на экспрессию AhR-зависимых микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р, в промоторах генов (или генов-хозяев) которых есть XRE последовательности

Для оценки влияния БП на экспрессию микроРНК, потенциально регулируемых AhR, в легких крыс с помощью анализа *in silico* [252] были выбраны микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р, в промоторах генов (или генов-хозяев) которых были обнаружены последовательности сайтов связывания AhR.

Для оценки длительности эффектов БП на экспрессию микроРНК и их генов-мишеней крыс, получавших однократную дозу БП (75 мг/кг), усыпляли в течение разных промежутков времени после инъекции (24, 48 и 72 часа). При остром воздействии БП максимальный эффект на изменение экспрессии выбранных нами микроРНК наблюдался через 24 часа после инъекции, а спустя 72 часа, экспрессия микроРНК в большинстве случаев возвращалась к изначальному уровню. Уровень микроРНК-483-3р увеличивался (в 2,1 раза) у самок в первые сутки после инъекций, а затем плавно снижался на третьи сутки (в 1,4 раза). Достоверных различий в экспрессии микроРНК-193b-5р при остром воздействии БП выявлено не было. Уровень микроРНК-29а-3р достоверно снижался в 2,5 раза у самок на первый день после воздействия, однако у самцов статистически значимых различий при проведении времязависимого эксперимента не было обнаружено (Таблица 48).

Таблица 48 – Относительный уровень AhR-зависимых 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.

Наиболее яркие половые различия были выявлены для микроРНК-22-3р. У самцов ее уровень достоверно увеличивался в 1,7–2,4 раза, тогда как у самок в первый день падал (в 2 раза), но потом быстро возвращался к начальному значению (см. таблицу 48).

Влияние хронического введения бензо(а)пирена на экспрессию AhR-зависимых микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р

В нашем эксперименте в результате хронического введения БП наиболее выраженные изменения экспрессии микроРНК происходили у самцов, у самок же изменения были менее выражены или отсутствовали вовсе. В легких самцов, обработанных БП, происходило 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 у обработанных крыс, получивших дозу 50 мг/кг, по сравнению с контрольной группой (Рисунок 68). Несмотря на ожидаемые дозозависимые эффекты, мы обнаружили, что у самцов профиль экспрессии исследуемых микроРНК при дозах БП 10 и 50 мг/кг практически не отличался (Таблица 49, Рисунки 67, 68, 69 и 70).

Таблица 49 – 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)

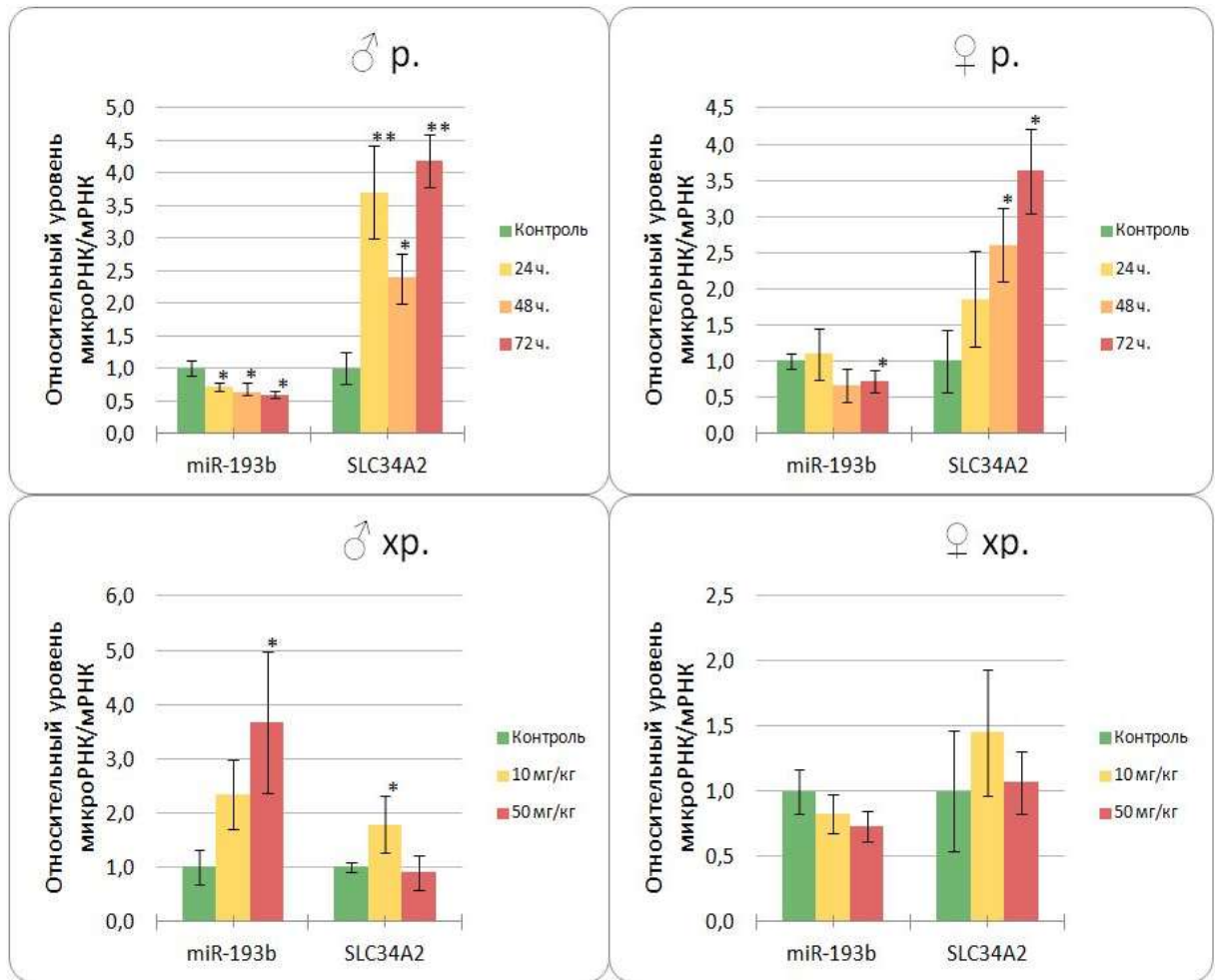
| miRs | Хроническое введение БП | | | | | |
|-------------|-------------------------|------------|-------------|-----------|------------|-----------|
| | ♂ | | | ♀ | | |
| | контроль | 10 мг/кг | 50 мг/кг | контроль | 10 мг/кг | 50 мг/кг |
| miR-22-3р | 1,00 ± 0,05 | 1,7 ± 0,2* | 2,0 ± 0,2* | 1,0 ± 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.

У самок уровень микроРНК-483-3р повышался в 1,9 раз при введении БП дозой 10 мг/кг. Уровень остальных микроРНК у самок под действием БП вопреки ожиданиям оказался неизменным в сравнении с контрольной группой (см. таблицу 49; Рисунки 67, 68, 69 и 70).

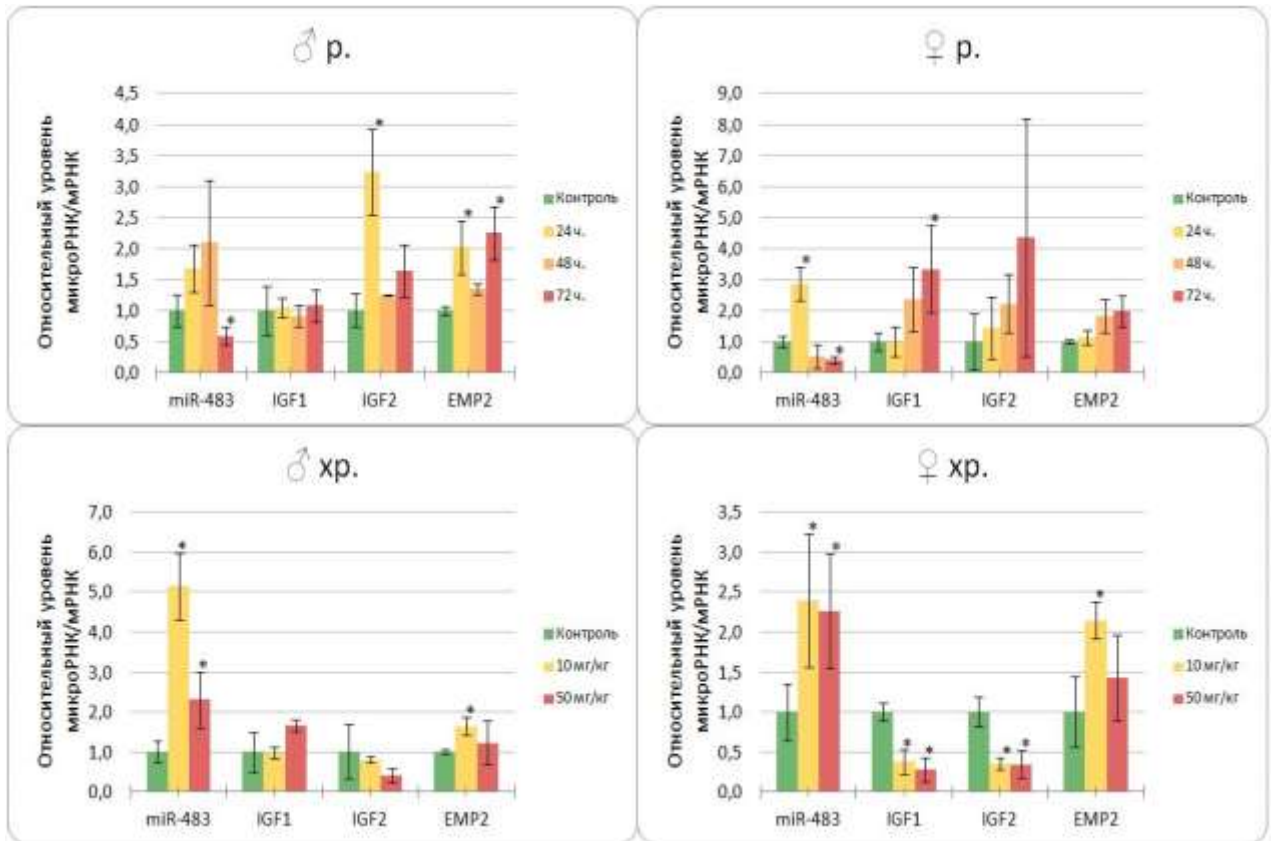
Влияние бензо(а)пирена на экспрессию генов EGFL7, EMP2, IGF1, IGF2, ITGA6, PTEN, SLC34A2 (in vivo)

В результате однократного введения БП наиболее выраженные изменения экспрессии исследуемых генов-мишеней как у самок, так и у самцов наблюдались для *SLC34A2* (повышение в 2,4–4,2 раза), *EMP2* (повышение в 1,3–2,2 раза) и *ITGA6* (падение в 2,0–2,5 раза). Уровень экспрессии гена *IGF1* достоверно не изменился ни в одной группе (см. таблицу 46). Кроме этого, у самцов при введении БП происходило понижение уровня экспрессии гена *PTEN* в 1,7 раза спустя 48 часов после инъекций. Экспрессия гена-хозяина микроРНК-483 – *IGF2* – изменялась только у самцов (повысилась в 3,2 раза), спустя 24 часа после введения БП (Рисунки 67, 68, 69 и 70).



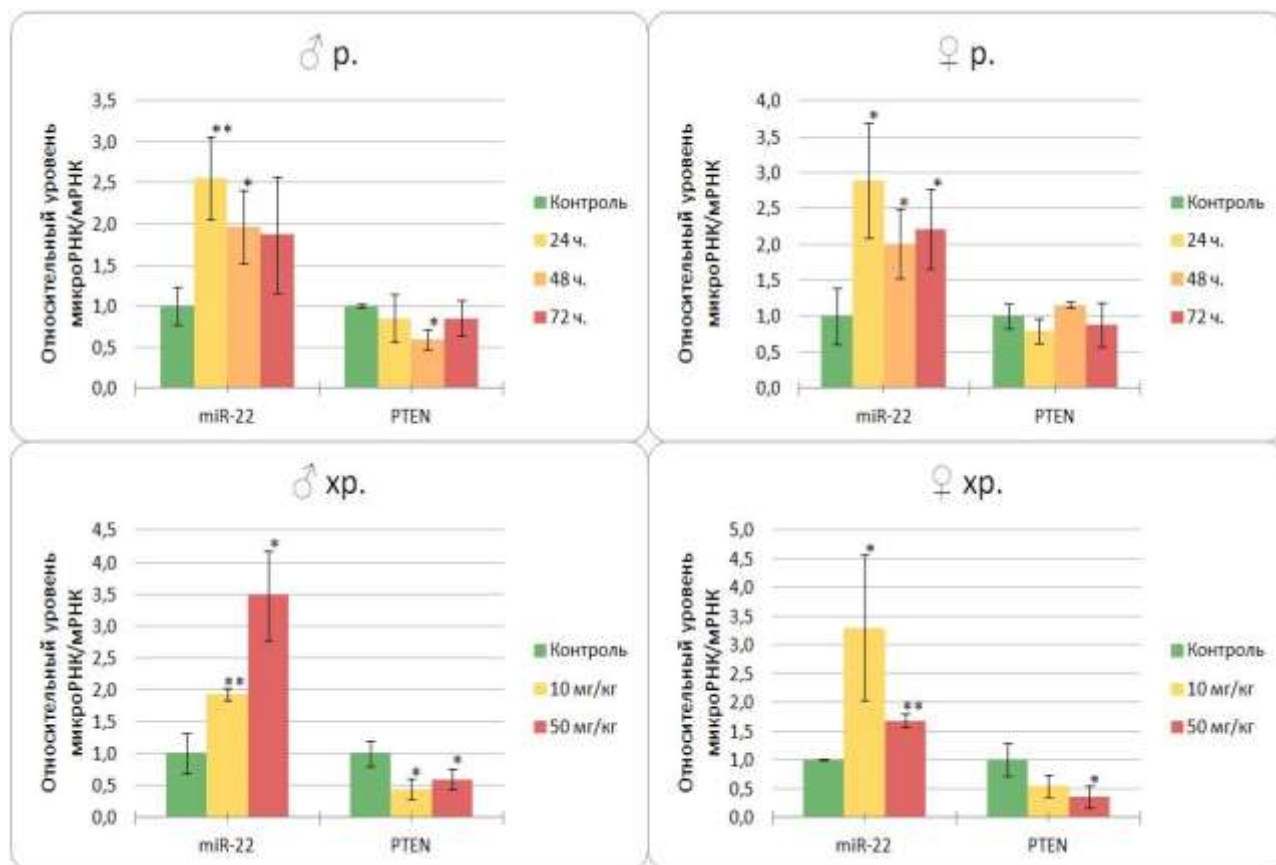
Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента; ** – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента).

Рисунок 67 – Относительный уровень микроРНК-193b, а также ее гена-мишени *SLC34A2* в легких крыс Вистар, инкубированных с 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 ($n = 4$)



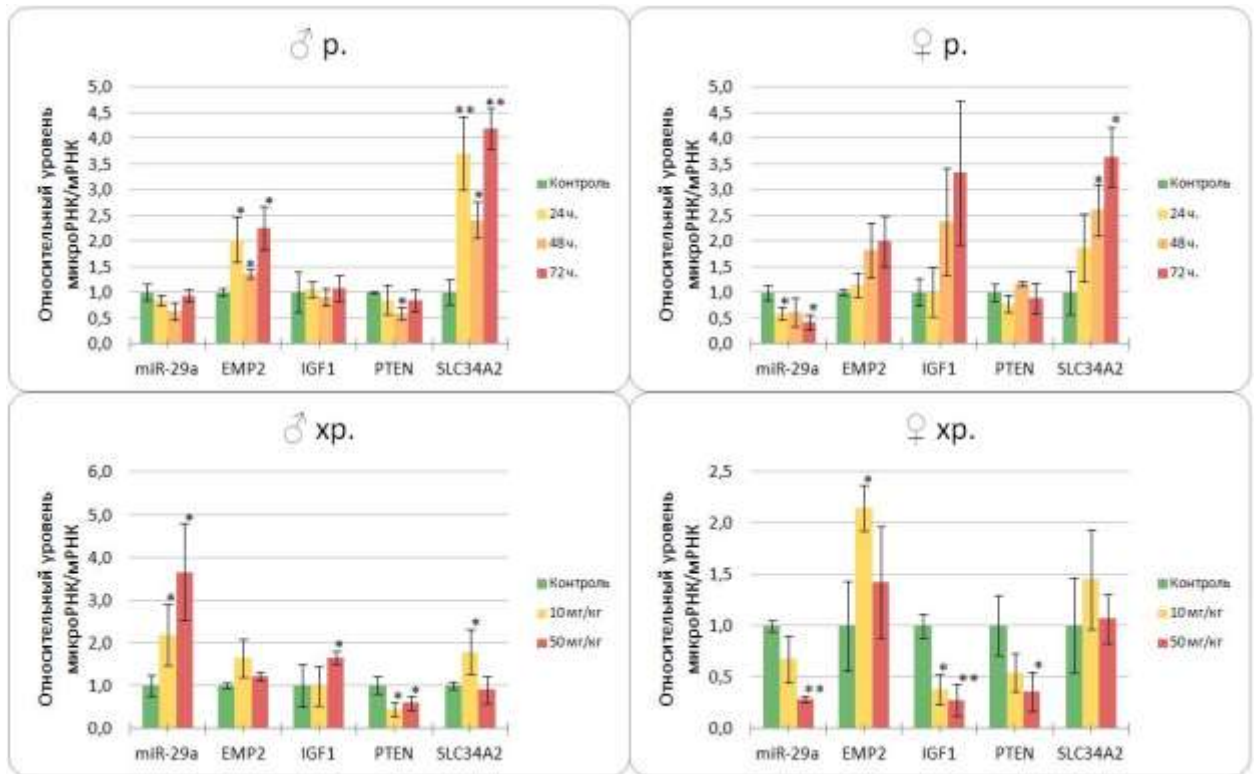
Примечание: * – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$) по критерию Стьюдента; ** – достоверность различий по сравнению с контролем ($p < 0,01$) по критерию Стьюдента).

Рисунок 68 – Относительный уровень микроРНК-483, а также ее гена-«хозяина» *IGF2* и генов-мишеней *IGF1* и *EMP2* в легких крыс Вистар, инкубированных с 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 ($n = 4$)



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.

Рисунок 69 – Относительный уровень микроРНК-22, а также ее гена-мишени *PTEN* в легких крыс Вистар, инкубированных с 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 ($n = 4$)



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.

Рисунок 70 – Относительный уровень микроРНК-29а, а также ее генов-мишеней *EMP2*, *IGF1*, *PTEN*, *SLC34A2* в легких крыс Вистар, инкубированных с 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 ($n = 4$).

В результате хронического введения БП наиболее выраженные изменения экспрессии исследуемых генов наблюдались у самок – происходило понижение экспрессии большинства из них (*IGF1/2*, *ITGA6*, *PTEN*) в 1,7–3,3 раза. Исключение составили гены: *EMP2* – уровень его экспрессии был повышен в

2,1 раза при дозе 10 мг/кг, и *SLC34A2* – экспрессия этого гена у самок не изменилась. Хроническое введение БП самцам крыс приводило к падению экспрессии генов *ITGA6* и *PTEN* в 1,7–3,3 раза при дозах 10 и 50 мг/кг, а также к повышению *SLC34A2* в 1,8 раза при дозе 10 мг/кг. Относительный уровень остальных исследуемых генов, по сравнению с контролем остался неизменным (см. таблицу 47).

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время рак легкого занимает второе место (11,4 %) в общей структуре онкологической заболеваемости в мировой статистике и является одним из ведущих заболеваний с высокой смертностью до 18 %. По данным сайта Интернационального Агентства Исследований Рака в 2020 году в мире количество заболевших раком легкого достигло 2,206 млн человек. При этом в структуре общей смертности от злокачественных новообразований рак легкого остается на первом месте и в 2020 году этот показатель составил 1,796 млн человек [51, 135, 301]. Наибольшую распространенность рак легких имеет в странах Азии (особенно в Восточной – 1,012 млн человек), в Европе (476 тысяч), в Северной Америке (254 тысячи). Меньшие показатели имеют страны Африки (46,6 тысяч), что, скорее всего, связано с низким уровнем развития медицинского обеспечения и диагностики [51, 97, 135]. Заболеваемость раком легкого в развитых странах несколько уменьшилась из-за проведения активной социальной политики борьбы с курением и все более широкого использования низкодозной КТ (НДКТ) в качестве скрининговых технологий [51, 97, 301].

Россия не является исключением по данному заболеванию, и абсолютные показатели заболеваемости РЛ в 2010 году составили 56 985 случаев. В 2021 году абсолютное число заболевших составило 56 328 случаев, нужно сказать, что в 2019 году этот показатель составлял 60 113 случая, а пик заболеваемости за этот период пришелся на 2017 год – 62 175 случаев. В целом значимых колебаний заболеваемости РЛ за последние десятилетия не отмечалось [9, 10]. Показатель заболеваемости РЛ в НСО для обоих полов имеет тенденцию к снижению: 1 354 заболевших в 2019 году и 1 023 заболевших в 2021 году (см. таблицу 9). Данный факт труднообъясним с точки зрения доказательной медицины, т. к. за этот период времени на территории НСО не проводилось каких-либо значимых мероприятий по формированию здорового образа жизни и снижению влияния основного этиологического фактора – курения. Отчасти на этот показатель могла повлиять новая коронавирусная инфекция, т. к. работа первичного звена была

направлена на борьбу с пандемией, а плановые обследования и диспансеризация не проводились, что привело к снижению доступности современных методов обследования и снижению выявляемости РЛ.

Наряду с этим в НСО остается неблагоприятной ситуация по загрязнению окружающей среды (промышленная сфера, выхлопные газы автомобилей, лесные пожары). По этому показателю Новосибирск находится между такими крупными городами как Москва и Санкт-Петербург. Большую роль в экологическом состоянии местности играет и местоположение края: под Новосибирской областью залегает гранитная плита, содержащая радон, избыточное содержание этого газа в атмосфере и аккумуляция его в закрытых и подвальных помещениях может увеличивать риск развития рака легкого [13, 282, 331].

Однако, обращает на себя внимание влияние гендерного фактора на показатель заболеваемости РЛ в НСО. Заболеваемость среди мужского населения имеет постоянную тенденцию к снижению – с 1 162 заболевших в 2010 году до 811 заболевших в 2021 году. Среди женского населения с 2010 года по 2019 год отмечался рост заболеваемости с 248 до 315 соответственно, и лишь в 2021 году этот показатель составил 212 заболевших (см. таблицу 9) [6, 9,10]. Не смотря на то, что женщины примерно в 3-4 раза реже болеют РЛ чем мужчины, общемировой рост заболеваемости РЛ среди женского населения очевиден, и причинами этого могут выступать не только вредные факторы окружающей среды или курение, но и различия в гистологической структуре РЛ, особенности метаболизма, активности ферментных систем (цитохрома Р450 и его изоформ), что в свою очередь может объяснить разные пути канцерогенеза РЛ [52, 331, 347].

Показатель смертности от РЛ в России продолжает занимать верхнюю строчку в структуре смертности от всех злокачественных новообразований, и в 2021 году составлял 16,8 %. Для сравнения: второе место занимает смертность от рака желудка, что составляло в 2021 году 9 % [9, 10]. Надо отметить, что смертность от РЛ для обоих полов с 2011 по 2021 год снизилась и составила в 2011 году 35,28 на 100 тыс. населения, а в 2021 году – 32,08 на 100 тыс. населения. В тоже время гендерные различия в заболеваемости РЛ

пропорционально отразились и на показателях летальности. Если среди мужского населения смертность за 10-летний период (2011–2021 гг.) снизилась, то для женского населения, наоборот, этот показатель имеет тенденцию к росту, так смертность в РФ для женского населения в 2011 году была 8 673 умерших, а в 2021 году составила 9 447 умерших в абсолютных цифрах, прирост составил 9,38 %. В Новосибирской области, в отличие от общероссийских, показатель смертности от РЛ для обоих полов имеет стабильные показатели – 1 147 умерших в 2010 году и 1 140 умерших в 2021 году; хотя имеется тенденция снижения смертности среди мужского населения – с 960 умерших в 2010 году до 909 умерших в 2021 году, для женского населения отмечен рост смертности с 187 умерших в 2010 году до 231 умерших в 2021 году (см. таблицу 10) [9, 10].

Большинство статистических баз по изучению заболеваемости и смертности от рака легкого как в России, так и в мире не учитывают гистологический тип рака легкого. Особенность нашего исследования заключалась в оценке выживаемости в зависимости от пола, возраста, стадии и статуса курения, проведенной отдельно для ПКРЛ и АКЛ, более того проведена оценка влияния на выживаемость и самого гистотипа РЛ.

В ходе работы, при анализе 6 056 случаев рака легкого в НСО для обоих гистотипов отмечен общий экспоненциальный вид функции выживаемости, характеризующий низкую пятилетнюю выживаемость (19,06 % для ПКРЛ и 18,48 % для АКЛ), и достаточно длинный период выживания – свыше 15 лет для пациентов старше 65 лет, диагностированных на I-II стадии (1,56 % – ПКРЛ и 1,05 % – АКЛ). Двухлетняя выживаемость для пациентов с ПКРЛ колеблется на уровне 32,67 %, с АКЛ – 30,72 % (см. таблицу 11). Полученные результаты коррелируют с общемировыми показателями двухлетней выживаемости в пределах 30–40 %, пятилетней – 19–20 % [97]. Однако при сравнении медианных значений выживаемости для выборок ПКРЛ и АКЛ тестовая статистика свидетельствует о достоверном влиянии гистологического типа рака легкого на общую выживаемость, медиана для ПКРЛ – 14,5 месяцев, АКЛ – 18 месяцев. Различие медианных значений данного показателя отличается в 1,24 раза, хотя

смещение временного ряда ПКРЛ относительно АКЛ небольшое, но достоверное (уровень значимости составляет 0,0164) (см. таблицу 12, рисунок 20). Таким образом, пациенты с АКЛ имеют более благоприятный профиль медианы выживаемости. Аналогичные данные были получены в крупном ретроспективном исследовании базы данных в Тайване. В исследование были включены 37 463 пациента, получавших лечение в период 2009–2014 гг. Большинство пациентов имели АК (77,4 %), тогда как ПКРЛ был отмечен у 22,6 % пациентов. В этом исследовании отмечено статистически значимое преимущество общей 5-летней выживаемости в группе больных с АКЛ. Кроме того, тайванские исследователи провели анализ выживаемости в зависимости от стадии (TNM) и показали преимущество выживаемости у пациентов с АКЛ для всех стадий. Также были получены дополнительные интересные находки, например, АКЛ чаще диагностировалась в более молодом возрасте и на более ранней стадии, чем ПКРЛ, хотя с другой стороны АКЛ имела тенденцию к более частому появлению отдаленных метастазов [329].

Мы также провели категорирование влияния возраста и пола на выживаемость пациентов с разным гистотипом. Для возрастных подгрупп мужчин наблюдается высокая достоверность влияния гистотипа на выживаемость только в категории старше 75 лет, что вероятно может объяснять влияние на выживаемость у мужчин более молодого возраста других коморбидных факторов (см. таблицу 13). Известно, что у мужчин чаще встречается плоскоклеточный рак легкого, который имеет связь с курением, что в свою очередь может вызывать развитие ХОБЛ, ИБС, которые потенциально значимо влияют на смертность у этой категории пациентов, тем самым нивелируя прямое влияние только гистотипа [97, 329]. Для женщин гистотип с доверительной вероятностью более 99,999 % влияет на выживаемость ($p = 0,00009$), это можно объяснить более частой встречаемостью у женщин АКЛ, а также женщины в меньше мере подвержены курению, что уменьшает влияние на смертность коморбидных факторов (см. таблицу 13) [179]. Что касается влияния гистотипа на медиану выживаемости по возрастным подгруппам в целом, то в нашей работе можно

говорить о достоверном влиянии этого фактора, начиная с возраста 61 год и старше (где уровень значимости равен 0,00001) (см. таблица 16, рисунок 22).

Продолжая рассматривать 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. Вероятно, здесь немаловажную роль играет факт преобладания количества мужчин над женщинами (мужчины – 87,81 %, женщины – 9,21 %) и, возможно, наличие общего главенствующего фактора риска развития данного гистотипа РЛ – курения. В тоже время для выборки пациентов с АКЛ, где доля женщин составила 30,34 %, а мужчин – 69,65 %, медиана выживаемости у женщин была в 2,01 раза выше, чем таковая у мужчин (см. рисунок 23). Необходимо заметить, что фактор пола в нашей работе не претендует на строгое понимание этого понятия как биологической характеристики пациента. Под этими различиями могут скрываться как социально-поведенческие факторы, влияющие на продолжительность жизни в целом, отношение к своему здоровью, частота прохождения диспансеризации, анамнез вредных привычек мужчин и женщин, так и весь спектр биологических особенностей, например, гормональная регуляция организма, генетические особенности (драйверные мутации EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, HER2). Кроме того, при анализе научных публикаций в основном рассматривается связь гендерных различий и риска развития рака легкого, но не влияние половой принадлежности на выживаемость.

В рамках эпидемиологического анализа в работе проведена оценка влияния стадии на выживаемость пациентов с РЛ. С одной стороны очевидна зависимость прогноза от распространенности РЛ, и наше исследование подтвердило эту закономерность, так медиана выживаемости в подгруппах от первой к четвертой стадии имела достоверные различия и для ПКРЛ, и для АКЛ и меняла свои значения в 3,5 раза. Наблюдалось закономерное уменьшение медианы выживаемости от первой к четвертой стадии: от 2,8–3,0 года на первой до 6,8–10,0 месяца на четвертой (см. таблицу 15, рисунок 21). С другой стороны

ранняя диагностика РЛ остается чрезвычайно важной проблемой во всем мире [97, 239, 308]. В НСО около 68 % пациентов как с ПКРЛ, так и АКЛ диагностируются на III и IV стадиях заболевания.

Внедрение низкодозной КТ (НДКТ) в качестве рутинного скрининга является одним из ключей к решению этой проблемы. Ряд проспективных рандомизированных исследований показали, что НДКТ может снижать летальность от РЛ на 20 % и более [277, 284, 316]. Важно отметить, что НДКТ необходимо применять только в группе риска, которая включает в себя людей от 50 до 80 лет с индексом курения 30 пачка/лет. Успешность внедрения программы скрининга с использованием НДКТ также зависит от ряда факторов, таких как технологические, организационные, географические, экономические, и в целом от возможностей системы здравоохранения конкретного региона или страны [277, 316]. Не смотря на наличие в НСО значимых факторов риска, приводящих к развитию РЛ, в нашем регионе до сих пор не предпринимаются меры по развитию скрининговых программ. Однако справедливости ради необходимо сказать, что в некоторых регионах РФ имеется опыт успешного использования НДКТ как скрининга РЛ, например, в Москве, Санкт-Петербурге, Тюмени, Красноярском крае.

В нашем исследовании для доказательства вклада курения в патогенез развития РЛ мы использовали несколько подходов. Вначале было проведено клинико-эпидемиологическое исследование с оценкой 1 354 пациентов с НМРЛ.

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, кроме этого, длительное курение приводило к более раннему возникновению РЛ по сравнению с некурильщиками: ПКРЛ возникает раньше в среднем на 4,03 года, а АКЛ – на 5,29 года (см. таблицу 18, рисунок 24).

Курение является наиболее признанным фактором риска развития рака легкого. При анализе различных исследований отмечено, что влияние курения на развития рака легкого имеет определенную закономерность. Сначала отмечается

пик распространенности курения, например, в США среди мужского населения это произошло в 1960-е годы, а затем, спустя 20 лет, возникает пик заболеваемости РЛ, что соответствовало 1980-м годам. Далее, благодаря принятым мерам по борьбе с курением, заболеваемость РЛ начал снижаться к концу 1990-х годов, и в настоящее время смертность от РЛ среди мужского населения в США в среднем снижается на 2,9 % в год [53].

При анализе научной литературы было отмечено, что факт курения может по-разному влиять на прогноз и риск возникновения РЛ в зависимости от пола [128, 180, 309]. По нашим данным для некурящих женщин различия в медианных значениях выживаемости ПКРЛ и АКЛ отличаются в 2,02 раза, тогда как для курящих женщин разница выживаемости между ПКРЛ и АКЛ нивелируется. Таким образом, при активном длительном курении женщин ПКРЛ достоверно ухудшает и так неблагоприятный прогноз.

Такие различия могут быть объяснены разными факторами. Ряд исследований подтверждают, что курящие женщины более подвержены развитию рака легкого, чем мужчины. Было показано, что курящие женщины имели большее количество аддуктов ДНК в здоровой легочной ткани, что может способствовать канцерогенезу [85, 90]. Более того у курящих женщин чаще встречаются мутации в генах *TP53* и *KRAS*, которые связаны с развитием ряда злокачественных опухолей, в том числе и рака легкого [168, 309]. С другой стороны такие различия объясняются гормональным фоном у женщин. Так, например, у женщин рак легкого чаще диагностируется в пременопаузе в сравнении с мужчинами того же возраста (моложе 50 лет). Исследования на азиатской популяции показали трехкратное увеличение риска возникновения РЛ у курящих женщин с укороченным менструальным циклом, что приводит к более частому колебанию уровня эстрогенов в крови в течение репродуктивного возраста. Кроме того, курящие женщины, получавшие заместительную гормональную терапию, имели в два раза выше риск заболеть аденокарциномой легкого, чем не курящие [143, 309, 349, 378].

Еще более интересные результаты были получены при изучении трансгендеров. В том случае, когда смена пола производилась из мужчины на женщину, количество смертей от РЛ было выше, чем в общей популяции, а при смене пола из женщины на мужчину разницы в смертности от РЛ не отмечалось [21].

В целом нет сомнений, что факт курения является не только одной из ведущих причин возникновения РЛ, но и ухудшает прогноз, причем по-разному в зависимости от пола.

В эпоху персонафицированной медицины перед онкологом стоят задачи определения клинических предикторов, которые позволяют назначать максимально эффективное лечение. Такими предикторами могут быть драйверные мутации, определяемые в АКЛ, что дает возможность в случае их выявления применять таргетную терапию [59, 226]. Известно, что НМРЛ в 35–45 % случаев представлен именно АКЛ, а мутация в гене *EGFR* является наиболее частой в данном подтипе РЛ. Существуют различия по частоте встречаемости этой мутации в зависимости от расы: в европейской популяции этот показатель варьирует от 9 % до 20 %, в азиатской – достигает 50 %, в Латинской Америке – около 26 %, а в Африканских странах – от 2 % до 14 % [54, 67, 122]. Следовательно, изучение соматической мутации в гене *EGFR* является важным и актуальным направлением в клинической онкологии [65, 136, 362, 372]. В нашей работе мы изучили частоту этой мутации у 549 пациентов и распределение ее в зависимости от пола и статуса курения (см. таблицу 20). 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 [94].

Интересное исследование было проведено в 2015 году группой тайваньских ученых, которые изучили влияние статуса курения и пола на частоту мутации

EGFR в аденокарциноме легкого. В это исследование было включено 1 175 пациентов, а мутации *EGFR* выявлены у 767 пациентов (59,6 %). Наиболее часто встречались мутации L858R (43,7 %) и 19Del (37,4 %), интересно, что на европейской популяции частота встречаемости мутации 19Del выше, чем L858R [122]. В результате проделанной работы было выявлено, что курение может влиять на тип мутации: у некурильщиков чаще встречалась L858R в 50,2 % случаев, тогда как 19Del – в 38,8 % случаев, для курильщиков получены обратные результаты: L858R – 35,2 %; 19Del – 52,8 %. Обе мутации встречались чаще у некурящих женщин, среди курильщиков мутации преобладали у мужчин – 22,3 %, у женщин – 10,7 %, такие же тенденции были получены и в нашем анализе [94].

В ряде исследований установлена закономерность в повышенной частоте мутации *EGFR* у некурящих пациентов, как у мужчин, так и у женщин в пределах 40–50 %, тогда как у курящих пациентов этот показатель не превышает 10 % [183]. С другой стороны, недавний мета-анализ показал улучшение показателей выживаемости без прогрессирования (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) при одновременном применении ингибиторов ангиогенеза (VEGF) и ингибиторов *EGFR* у курильщиков с мутацией *EGFR*. Это может объясняться тем, что курение – мощный мутагенный фактор, который вызывает дополнительные соматические мутации, например, TP53, что объясняет лечебный эффект ингибиторов VEGF [100, 108, 156, 254]. Эти данные интересно согласуются и с нашим эпидемиологическим анализом, где мы установили, что фактор курения ухудшает показатели выживаемости как при ПКРЛ, так и при АКЛ.

Таким образом, портрет пациента «мужчина с АКЛ, курением в анамнезе и наличием мутации *EGFR*», является самым неблагоприятным, а комбинированная таргетная терапия при таком сочетании неблагоприятных факторов может улучшить результаты лечения [108, 156]. Молекулярно-генетическое тестирование АКЛ и выявление мутации *EGFR* в настоящее время является стандартным и рутинным подходом в лечение рака легкого, однако таргетная терапия, включая ИТК 3-го поколения, имеет свои ограничения, которые проявляются в развитии резистентности к лечению и прогрессировании

заболевания [291]. Исходя из этого, можно говорить, что раннее выявление предикторов резистентности, является залогом своевременного изменения стратегии лечения, что может улучшать результаты лечения.

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 [56, 343, 172]. 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 (см. таблицу 23).

Анализ плазмы на наличие мутации *EGFR* в циркулирующей ДНК может быть использован не только для раннего мониторинга рецидива РЛ, но и для первичной диагностики в случае если у пациента невозможно выполнить тканевую биопсию из опухоли, однако нужно отметить, что тканевая биопсия является более предпочтительной и более информативной опцией в отношении выявления данной мутации [172, 343]. Также важно понимать, что у метода «жидкой» биопсии есть и недостатки. С одной стороны чувствительность метода не превышает 30 %, а с другой стороны резистентность к ИТК может быть обусловлена не только новыми мутациями в *EGFR*, но и другими механизмами, например, трансформацией в мелкоклеточный или плоскоклеточный рак легкого, появлением мутаций в других сигнальных путях (амплификации MET или HER2, мутации NRAS, PI3KCA, слияния ALK, RET) [161, 291, 292].

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. В геноме человека идентифицировано 3 915 AhR-связывающих сайтов. Многие из этих сайтов в настоящее время не изучены глубоко и требуют экспериментального подтверждения их роли в различных биологических процессах [129].

Мы оценили изменение экспрессии «классических» генов-мишеней AhR цитохромов P450 (CYP) первого семейства CYP1A/B для доказательства активации AhR под воздействием БП [144]. В результате в нашем исследовании на животных (крысах) мы увидели повышение экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1* как при однократном, так и при хроническом воздействии БП по сравнению с контролем. Более драматическое повышение экспрессии было выявлено при однократном воздействии (в 26–73 раза) по сравнению с хроническим воздействием, где повышение экспрессии было в среднем в 5 раз (см. рисунок 66, таблицы 46 и 47). Такие различия, возможно, связаны с активацией ферментов деградации AhR, а также, как было показано в недавних исследованиях, с активацией репрессора этого рецептора (AhRR) [71]. 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 (см. таблицы 46 и 47, рисунок 66). Гиперэкспрессия этих ферментов вовлечена в метаболизм эстрогенов у женщин и ассоциирована с повышенным содержанием аддуктов метаболитов эстрогенов с ДНК, таким образом, двойной путь образования аддуктов ДНК через метаболизм эстрогенов и БП может приводить к различиям в генотоксических эффектах у мужчин и женщин [292]. Как раз этот факт объясняется кумулятивным эффектом в результате метаболизма эстрогенов у самок, что, таким образом, может отражаться в более мощном канцерогенном эффекте курения у женщин [129].

В нашем исследовании основной акцент сделан на изучение уровня экспрессии AhR-регулируемых микроРНК. В промоторах некоторых межгенных микроРНК, а также их генов-хозяев имеются *DRE* элементы – сайты связывания AhR. С помощью анализа *in silico* был проведен поиск таких элементов в геномах крыс, мышей, человека, и найдено 154 гена с *DRE* в геноме человека [99, 252]. Таким образом, AhR-зависимая регуляция экспрессии микроРНК может осуществляться через такое связывание с *DRE* элементами.

В недавних исследованиях на мышах с AhR⁺ и AhR⁻ в легочной ткани проводили хроническое воздействие (4 недели) сигаретным дымом с последующим изучением изменения экспрессии различного спектра микроРНК. Были получены интересные данные о том, что мыши с AhR⁺ и AhR⁻ под воздействием сигаретного дыма по-разному изменяли экспрессию исследуемых микроРНК. Так мыши с AhR⁻ в большей степени повышали экспрессию микроРНК, связанных со злокачественной трансформацией, а мыши с AhR⁺ повышали экспрессию противовоспалительных микроРНК. Не менее интересным оказался факт регуляции микроРНК 196a, -96 и -34c в ткани легкого в отсутствие воздействия экзогенного лиганда на AhR [46].

В нашем исследовании мы впервые получили результат на животных, доказывающий влияние бензо(а)пирена на экспрессию микроРНК у самок и самцов крыс. С помощью биоинформатического анализа отобраны четыре микроРНК-22-3p, -29a-3p, -193b-5p, -483-3p в промоторах генов или их генов-хозяев были обнаружены сайты связывания с AhR. Получены разные результаты изменения экспрессии микроРНК в зависимости от однократного или хронического введения бензо(а)пирена, более того мы наблюдали и гендерные различия. Наибольшие изменения коснулись экспрессии микроРНК-22-3p, 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. При хроническом воздействии у самцов обнаружено статистически значимое повышение уровня всех исследуемых микроРНК в 1,5–2,2 раза, за исключением микроРНК-483-3p, уровень экспрессии которой

был в 2,5 раза ниже, чем в контрольной группе. У самок значимых различий в экспрессии не было выявлено (см. таблицу 49, рисунки 67, 68, 69 и 70).

Такие гендерные различия могут быть связаны с гормональными особенностями, например, микроРНК-22-3р, экспрессия которой меняется по-разному у самцов и самок, связана с активностью эстрогенового рецептора (ER), в результате пересечения сигнальных путей, регулируемых ER и AhR под воздействием бензо(а)пирена могут проявляться физиологические последствия их одновременной активации у разных полов, что может приводить к молекулярным различиям канцерогенного действия БП [296].

Кроме того, повышение экспрессии микроРНК-22-3р, -29а-3р, -193b-5р у самцов при хроническом воздействии бензо(а)пирена может быть связано с развитием воспалительного процесса. Такая связь прослеживается с микроРНК-193b-5р, ее уровень экспрессии может регулироваться фактором транскрипции STAT5, который активируется провоспалительными цитокинами [297]. Не смотря на наличие ERE в промоторах генов, выбранных нами микроРНК, большинство наблюдаемых эффектов при хроническом воздействии БП свидетельствуют об отсутствии прямой транскрипционной регуляции этих микроРНК эстрогеновым рецептором, что в свою очередь выражалось в отсутствии изменения экспрессии микроРНК у самок [46].

Более того анализ экспрессии исследуемых микроРНК в опухолях легких человека с использованием базы данных TCGA также показал существенные изменения, которые зависели от гистотипа НМРЛ. Однако зависимость от курения выявлена лишь для микроРНК-193b в образцах АКЛ, что открывает новые возможности для поиска специфических мишеней для этого вида рака легкого у курильщиков (см. рисунки 53, 54, 55, 56, 57 и 58). Важно также отметить, что профили экспрессии исследуемых микроРНК существенно различались для ПКРЛ и АКЛ, что подтверждает различный механизм канцерогенеза.

Таким образом экспериментальные данные полученные на животных доказали, что бензо(а)пирен через AhR наряду с изменением экспрессии

«классических» генов мишеней (*CYP1A1/B1*), изменяет экспрессию некоторых микроРНК вовлеченных в канцерогенез легкого.

Проведенный нами биоинформатический анализ экспрессии *AhR* в опухолевой ткани НМРЛ с использованием набора геномных данных, выложенных в открытом доступе UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu>) 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, что может свидетельствовать о разных биологических эффектах от воздействия курения в зависимости от гистотипа (см. рисунок 41). С другой стороны, мы также изучили метилирование промотора гена *AhR*. Известно, что метилирование ДНК в промоторной области генов предотвращает рекрутирование факторов транскрипции в консенсусную последовательность, что в конечном итоге приводит к снижению уровня экспрессии генов. Исследования, связанные с характеристикой гена *AhR*, продемонстрировали, что промотор гена *AhR* представляет собой GC-богатую область, в которой отсутствуют ССААТ и ТАТА-бокс, которая имеет, как минимум, четыре сайта связывания SP1. CpG островки могут легко подвергаться метилированию, что в конечном итоге может вызывать наблюдаемое нами ранее снижение уровня мРНК *AhR* [367]. Анализ уровня метилирования промотора гена *AhR* в опухолевых тканях НМРЛ показал достоверное снижение уровня метилирования промотора как в случае ПКРЛ, так и АКЛ (см. рисунок 42), при этом курение не вносило достоверного изменения в уровень метилирования (см. рисунок 42). Данный факт свидетельствует о том, что курение не вносит вклад в снижение уровня мРНК *AhR* в опухолевых тканях легкого посредством метилирования. 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 (см. таблицу 27) [299].

В этом контексте интересны исследования последних лет, показавшие, что курение значительно снижает метилирование промотора гена *AhRR* (репрессора *AhR*), что может объяснять один из механизмов снижения экспрессии *AhR*, причем эти изменения начинаются достаточно быстро после начала курения и длительно сохраняются у бывших курильщиков [37, 71].

С учетом того, что курение в большей степени связано с ПКРЛ, нами проанализированы данные TCGA с целью определения уровней экспрессии гена *AhRR* и уровня метилирования промотора его гена в образцах опухолей пациентов с этим гистотипом. Результаты показали, что уровень экспрессии *AhRR* у курильщиков повышен по сравнению с нормой и некурящими (см. рисунки 43 и 44). Результаты анализа уровня метилирования промотора гена *AhRR* в опухолевых тканях ПКРЛ показали, что вне зависимости от статуса курения этот показатель снижен в опухолевых образцах (см. рисунки 43 и 44). Эти результаты соответствуют данным TCGA, показавшим снижение уровня мРНК *AhR* в опухолях пациентов с НМРЛ. Что касается влияния уровня экспрессии *AhR* и *AhRR* на выживаемость больных с АКЛ и ПКРЛ в этом же анализе, то было показано, что уровень экспрессии *AhR* (высокая или низкая его экспрессия) не влияет на выживаемость пациентов (см. рисунки 45 и 46), тогда как высокая экспрессия *AhRR* имела тенденцию к ухудшению выживаемости у пациентов с АКЛ (данные статистически не достоверны) и практически не влияла на выживаемость у пациентов с ПКРЛ (см. рисунок 47). Данный факт повышает актуальность изучения генов-мишеней *AhR* (*CYP1A1*, *микроРНК*, *PD-L1*), которые могут быть более перспективными молекулярными маркерами как в диагностике и определении прогноза, так и в качестве терапевтического агента.

Результаты БИ анализа не показали достоверных различий между статусом курения, экспрессией *AhR* и его генов-мишеней в общей выборке пациентов. В нашем исследовании мы разделили общую выборку на две группы: с отсутствием и с наличием экспрессии *CYP1A1*, так как он является ключевым геном-мишенью

этого рецептора. Это позволило выявить различия в частоте встречаемости показателей экспрессии *CYP1A1* для различных гистотипов рака легкого (см. таблицу 28). Для пациентов с АКЛ была характерна взаимосвязь статуса курения с экспрессией *CYP1A1*: экспрессия была зарегистрирована для пациентов курильщиков, что подтверждается исследованиями других авторов [223]. У пациентов с ПКРЛ такой зависимости выявлено не было, однако уровень экспрессии *AhR* был повышен у пациентов с присутствием экспрессии *CYP1A1*; эти данные были показаны впервые, что может говорить в пользу преобладания классического генотоксического пути канцерогенеза (см. таблицу 29).

В этом контексте интересны исследования по изучению экспрессии не только *CYP1A1*, но и другого представителя семейства фермента Р450 *CYP1A2*, который локализуется главным образом в печени. Подобно ферменту *CYP1A1* в легких, *CYP1A2* также метаболизирует ПАУ, но может играть защитную роль против ПАУ-опосредованного канцерогенеза. Исследования на мышах показали увеличение количества ДНК-аддуктов в легких крыс с нулевым уровнем экспрессии *CYP1A2*, несмотря на его локализацию в печени. Кроме того, исследования обнаружили, что у людей с менее активным вариантом *CYP1A2* наблюдается повышенный риск развития рака легкого, тем самым подтверждая вероятную роль *CYP1A2* в канцерогенезе этого заболевания [223]. При анализе экспрессии мРНК *CYP1A2* в TCGA, Gastelum с соавторами обнаружили, что пациенты с АКЛ имели лучшие показатели выживаемости с более высоким уровнем экспрессии *CYP1A2* по сравнению с пациентами с низкой или средней экспрессией этого фермента [267, 223].

Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении различных механизмов в канцерогенез легкого у курильщиков и некурящих пациентов, а также позволяют рассматривать уровень экспрессии *CYP1A1* и *CYP1A2*, как потенциальный маркер прогноза НМРЛ и в качестве терапевтической модели.

Рассматривая эпигенетические пути канцерогенеза легкого в нашей работе с целью поиска новых молекулярных маркеров, мы определяли экспрессию некоторых микроРНК, которые являются мишенями *AhR* 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 AhRR под воздействием курения (см. таблицы 30 и 31). 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. В пользу этого говорят данные об экспрессии микроРНК-21 в различных типах злокачественных опухолей (см. таблицы 31 и 32) [268, 368]. Эти данные подтверждены в полученных нами ранее экспериментальных результатах на крысах, показавших, что хроническое введение БП сопровождалось усилением экспрессии AhR-регулируемых микроРНК. Такие различия уровней экспрессии микроРНК могут послужить основой более персонализированного профилирования опухолей внутри гистотипа, что в свою очередь служит потенциальным критерием оценки прогноза рака легкого и выбора методов лечения. Наши результаты также подтверждены в обзоре Iqbal с соавторами, где приведен список микроРНК (12 онкогенных и 10 онкосупрессорных), характерных для рака легкого. Следует отметить, что экспрессия большинства микроРНК, как и в нашем исследовании, снижается при курении. При этом важно, что одна микроРНК может при одном подтипе рака действовать как онкоген, а при другом подтипе рака – как онкосупрессор. Это может быть связано с генетическими потерями, эпигенетическими модификациями, широко распространенной репрессией транскрипции или дефектным биогенезом, что является основными причинами aberrаций на уровне зрелых микроРНК [199].

Более того, для подтверждения роли AhR в регуляции экспрессии микроРНК мы провели анализ экспрессии последних в исследуемых опухолевых образцах НМРЛ, разделив их по уровню мРНК *AhR* (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 двойной ролью в канцерогенезе, когда она может выступать как онкогеном, так и онкосупрессором (см. таблицу 33) [120]. 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 (см. таблицу 33).

Таким образом, используемый нами подход позволил выявить и дифференцировать *AhR*-зависимые микроРНК в различных опухолевых образцах НМРЛ в зависимости от курения.

Современные исследования последних лет показали, что *AhR* может регулировать уровень экспрессии гена *PD-L1*, через изменение экспрессии *AhR*-регулируемых микроРНК [252]. Экспрессия *PD-L1* является одним из ключевых факторов в регуляции иммунного противоопухолевого ответа. Более того, на дистальном промоторе гена *PD-L1* находятся 2 XRE-подобных элемента связывания *AhR*, что способствует активации экспрессии данного гена лигандами *AhR* [241, 261].

В клинической практике оценка *PD-L1* в опухоли методом ИГХ определяет выбор современной противоопухолевой терапии, в частности назначение ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (ингибиторы «чекпойнтов»). Основными точками приложения для моноклональных антител как терапевтического агента являются рецептор программированной смерти 1 (*PD1*), его лиганд (*PD-L1*) и гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (*CTLA-4*). Недавние исследования показали, что пациенты курильщики лучше отвечают на иммунотерапию, что может быть связано с более частой встречаемостью высокой экспрессии *PD-L1*. Именно высокая экспрессия *PD-L1* ($TPS > 50\%$) определяет эффективность иммунотерапии, что проявляется более высокой частотой

объективного ответа, выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости [57, 324]. С другой стороны, повышенная экспрессия PD-L1 на опухолевой клетке, является одной из причин ускользания опухоли от иммунного надзора.

Другим механизмом AhR-опосредованной иммуносупрессии может быть синтез избыточного количества метаболита триптофана кинуриина (Kyn), который катализируется ферментом IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase). Как и в злокачественных клетках Kyn может усиливать экспрессию PD-L1 в макрофагах, дендритных и других иммунокомпетентных клетках, где имеется высокая активность AhR [119, 324].

С учетом проведенного биоинформатического анализа и выявленных AhR-регулируемых микроРНК и PD-L1-регулирующих микроРНК мы сопоставили уровень экспрессии последних с уровнем PD-L1 в опухолевой ткани, определенным методом ИГХ. В опухолевой ткани пациентов 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 -146a для опухолевых образцов с высокой экспрессией PD-L1 (TPS > 50 %) (см. таблицы 38 и 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 сложным механизмов. Тем не менее, полученные результаты могут быть важны и с практической точки зрения. Известно, что у пациентов с АКЛ резистентность к иммунотерапии часто обусловлена наличием драйверных мутаций вне зависимости от статуса PD-L1, тогда как в случае ПКРЛ резистентность к ингибиторам «чекпойнтов» обуславливается отсутствием экспрессии PD-L1 в опухоли, или такая резистентность может возникнуть в процессе иммунотерапии. Более того, у части пациентов с высокой экспрессией PD-L1 существует первичная резистентность к иммунотерапии, поэтому у этой категории пациентов нужны дополнительные маркеры ответа на лечение [69,

188]. 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.

Так как *AhR* может менять не только экспрессию *PD-L1* посредством своих генов-мишеней (микроРНК), но и имеет XRE-подобный элемент связывания на промоторе гена *PD-L1*. В нашей работе мы провели оценку взаимосвязи экспрессии *AhR* с уровнем *PD-L1* в опухолевых образцах НМПЛ курильщиков. Результаты показали взаимосвязь уровня экспрессии *AhR* со статусом *PD-L1* как у пациентов с ПКРЛ, так и у пациентов с АКЛ. Достоверное повышение уровня экспрессии *AhR* было отмечено 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 (см. таблицы 43 и 44).

В этом разрезе интересно исследование Wang с соавторами., которые определяли экспрессию *AhR* и *PD-L1* в опухолях легкого с последующим лечением пембролизумабом (антитело к *PD-1* рецептору). Было показано, что опухоли с высокой экспрессией *AhR* и *PD-L1* имели большее количество частичных ответов на лечение, чем пациенты с высокой экспрессией только *PD-L1* и низкой экспрессией *AhR*, более того в этой группе было больше случаев с прогрессированием болезни на фоне проводимой иммунотерапии. Наряду с этим, в данном исследовании *AhR* рассматривался как не только предсказательный маркер на лечение, но и как терапевтическая модель, при которой блокада *AhR* позволит предотвращать ускользание опухоли от иммунного ответа организма [324].

Не смотря на то, что в настоящее время в клинической практике имеется большое количество ингибиторов «чекпойнтов», а также десятки молекул,

изучаются в клинических исследованиях, проблема резистентности к иммунотерапии сохраняет свою актуальность [57]. Наличие сложного механизма регулирования иммунной системы и разнообразных механизмов ускользания опухоли от иммунного ответа сподвигают нас на поиск новых подходов в лечении.

В связи с этим в нашей работе мы сосредоточились на изучении активности антиген-презентирующих клеток (АПК), в частности на дендритных клетках (ДК). Было установлено, что и созревание, и функциональная активность всех субпопуляций ДК у пациентов с НМРЛ снижены по сравнению с условно-здоровыми людьми. Следовательно, это наталкивает исследователей на продолжение исследования механизмов активации ДК *in vitro* с последующим введением активированных ДК пациенту в качестве вакцины.

Хотя сама идея использования противоопухолевых вакцин не нова, в исследованиях последних лет интерес к данному методу вновь возрастает, и в частности к изучению вакцин на основе дендритных клеток [89, 263, 320].

Группой китайских ученых в 2021 году опубликовано пилотное исследование на небольшой группе пациентов с распространенным РЛ по использованию вакцины на основе ДК, нагруженных аутологичным неоантигенным пептидом [263]. В этой работе было пролечено 12 пациентов с прогрессирующей формой рака легкого. На первом этапе проведено полноэкзомное секвенирование ДНК из опухоли и крови каждого пациента и идентифицировано в среднем 312 соматических мутаций. Далее при помощи биоинформатического анализа выявлено от 13 до 30 неоантигенов. Мононуклеарные клетки периферической крови собирали с помощью лейкофереза и культивировали в присутствии человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и человеческого интерлейкина-4 (IL-4) для индуцирования дифференцировки ДК. Затем ДК подвергали импульсной обработке в течение ночи неоантигенными пептидами для приготовления вакцины. Далее вакцина вводилась пациентам по разработанной схеме. В целом лечение было безопасным и хорошо переносилось.

Несмотря на то, что в исследование были включены уже предлеченные пациенты с плохим прогнозом, частота объективных ответов достигала 25 %, а контроль над заболеванием составил 75 %. Более того, ряд пациентов получали предшествующую иммунотерапию, которая не давала эффекта, а добавление вакцины способствовало достижению положительно ответа на лечение.

В целом авторы признают сложность подбора неоантигенов для приготовления вакцины, однако метод имеет наибольшие перспективы лечения в комбинированном варианте с ингибиторами PD1/PD-L1 [263].

Еще одним подходом для поиска новых маркеров является анализ генов-мишеней микроРНК, экспрессия которых изменена в образцах НМРЛ. Биоинформатический анализ показал, что такой мишенью может быть онкосупрессор PTEN (гомолог тензина и фосфатазы).

Ген *PTEN* отрицательно регулирует сигнальный путь PI3K-AKT-mTOR и приводит к остановке клеточного цикла в фазе G1 и апоптозу. Следовательно, снижение количества PTEN в клетке или изменение его функциональной активности вследствие мутаций может приводить к неконтролируемой активации клеточного цикла. Генетические мутации в гене *PTEN* были идентифицированы как основные драйверы многих опухолей при различных типах рака. В тоже время мутации в гене *PTEN* редко возникают при раке легкого [269]. С помощью портала cBioPortal мы оценили нарушения PTEN в выборках с АКЛ и сПКРЛ. В результате было обнаружено, что разнообразные нарушения PTEN значительно чаще возникают у пациентов с ПКРЛ (18 %), в то время как нарушения PTEN у пациентов с АКЛ встречаются в менее 2 % случаев (см. рисунок 50). При этом у пациентов с ПКРЛ доля мутаций среди всех нарушений PTEN составляет менее 2 %. Низкий процент мутаций в гене *PTEN* от общего количества нарушений может свидетельствовать о том, что в клетке может происходить транскрипционное или посттранскрипционное нарушение регуляции PTEN [269]. Мы проанализировали уровень мРНК *PTEN* в опухолевых тканях ПКРЛ, а также АКЛ, используя база данных UALCAN (см. рисунок 50). Анализ экспрессии гена *PTEN* показал, что его уровень снижается в опухолевых тканях как пациентов с

ПКРЛ, так и пациентов с АКЛ. Однако при распределении образцов по статусу курения пациентов было обнаружено, что курение вызывает достоверное снижение уровня мРНК *PTEN* только у пациентов с ПКРЛ. В опухолевых тканях с АКЛ курение не оказывало достоверного влияния на экспрессию *PTEN* (см. рисунок 50).

В нашей работе мы получили другие результаты, уровень экспрессии *PTEN* был достоверно снижен в опухолевых образцах пациентов с АКЛ как курильщиков, так и некурящих. У пациентов с ПКРЛ отмечалась тенденция к снижению экспрессии *PTEN* без статистической достоверности (см. таблицу 40).

С целью изучения возможных причин нарушений экспрессии *PTEN*, например, аберрантного метилирования ДНК, включая гиперметилирование и гипометилирование промоторов генов, был проведен биоинформатический анализ. Мы использовали онлайн-инструмент UALCAN для изучения метилирования ДНК *PTEN* и наблюдали значительное повышение уровня метилирования промотора *PTEN* в образцах ПКРЛ (см. рисунок 52 А). В то же время, результаты показали, что уровень метилирования не зависел от статуса курения пациентов (см. рисунок 52 В). Для сравнения: в образцах АКЛ не показано значительного изменения метилирования промотора гена *PTEN* по сравнению с нормальными тканями, и при сравнении групп пациентов, распределенных по статусу курения, эти данные также подтверждаются в современных исследованиях (см. рисунок 52 С, D) [192].

Известно, что микроРНК являются универсальным регулятором экспрессии генов посредством связывания с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) мРНК-мишени, что вызывает деградацию мРНК или репрессию трансляции. В связи с этим мы предположили, что микроРНК могут вносить значительный вклад в изменение уровня *PTEN* в опухолях НМРЛ.

Мы исследовали уровни дифференциально экспрессирующихся микроРНК, способных связываться с мРНК *PTEN* в опухолевых тканях ПКРЛ, по данным TCGA с использованием модуля LinkFinder базы данных LinkedOmics (см. рисунок 59). Было обнаружено большое количество микроРНК, которые

коррелировали как положительно, так и отрицательно с уровнем экспрессии *PTEN*. При дальнейшем анализе были выявлены пять микроРНК, которые показали максимально отрицательный коэффициент корреляции с уровнем экспрессии гена *PTEN* (см. рисунок 60). Наибольший интерес у нас вызвала микроРНК-301а-3р, поскольку у нее значение «context++ score percentile» составляет 90 %. Более того, в научной литературе есть данные, что эта микроРНК, действительно, регулирует *PTEN* [217, 275]. Показано, что уровень микроРНК-301а регулируется на транскрипционном уровне с участием факторов транскрипции HIF, которые активируются гипоксией [217]. Сигаретный дым также может вызывать активацию HIF, что может объяснять увеличение уровня микроРНК-301а у курящих пациентов [216]. Проведенный дополнительный БИ анализ позволил подтвердить, что экспрессия микроРНК-301а повышается в ПКРЛ, тогда как для АКЛ этот показатель не меняется. Поскольку данные, полученные биоинформатическим анализом доступных баз данных, требуют экспериментального подтверждения с образцами тканей и/или клеточными культурами, мы провели серию экспериментов для проверки нашего предположения о том, что в опухолевых тканях ПКРЛ может происходить индуцированная курением микроРНК-301а-опосредованная регуляция *PTEN* и PD-L1. Так при сравнении уровней мРНК *PTEN* в образцах опухолевой ткани с образцами прилежащей условно-нормальной ткани легкого было выявлено значимое ($p = 0,047$) снижение медианного значения ее уровня в опухоли в 1,37 раза. В свою очередь, при анализе в этих же образцах уровня микроРНК-301а было обнаружено значимое ($p = 0,0013$) увеличение медианы в 19 раз (см. рисунок 60). Таким образом, была обнаружена отрицательная корреляция между экспрессией микроРНК-301а и *PTEN* (см. рисунок 62).

При изучении корреляции между AhR-регулируемыми микроРНК-21, -93, -181а, и PD-L1-регулирующими микроРНК-155 с уровнем экспрессии *PTEN*, была выявлена достоверная отрицательная корреляция только для PD-L1-регулирующей микроРНК-155 у некурящих пациентов с АКЛ (см. таблицу 42). Интересно, что микроРНК-93, которая также имеет один из генов-мишеней *PTEN*,

показала достоверную положительную корреляцию с мРНК *PTEN* у курящих пациентов с АКЛ. Вероятно, эта микроРНК вовлечена в более сложные механизмы регуляции *PTEN* [169]. Известно, что большинство исследований по изучению микроРНК как терапевтической модели рассматривают нокдаун последних (микроРНК-93, - 543, - 494-3p, - 92a, - 26b, - 181, - 29b), которые могут связываться с 3'UTR *PTEN* и подавлять его при НМРЛ, однако интересен и факт наличия некоторых микроРНК, позитивно регулирующих *PTEN*, например, микроРНК-130, как и в нашем исследовании [95, 174, 238]. В этой сфере получены первые результаты улучшения выживаемости пациентов с НМРЛ при высокой экспрессии микроРНК-130, что очевидно связано со способностью последней связываться с мРНК *PTEN* и стабилизировать его [164, 192, 209]. Таким образом, эти результаты позволяют в дальнейшем рассматривать микроРНК-93 из нашей работы, как терапевтический агент, позитивно регулирующий *PTEN*.

Следует отметить, что в нашей работе при сопоставлении уровня экспрессии *PTEN* с уровнем PD-L1 было отмечено достоверное снижение экспрессии *PTEN* в опухолевых образцах курящих пациентов с АКЛ с умеренным уровнем PD-L1 (TPS 1–49 %) (см. таблицу 44). Для пациентов курильщиков с ПКРЛ такой связи не выявлено (см. таблицу 43). 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 канцерогенеза [192].

Более того, при распределении пациентов на две группы с высокой и низкой экспрессией *AhR* по медианному значению отмечалось повышение экспрессии *PTEN* в опухолевых образцах АКЛ с высокой экспрессией *AhR*, причем более выраженной у курящих пациентов по сравнению с некурящими. У пациентов с ПКРЛ таких изменений выявлено не было (см. таблицу 41). Таким образом, мы проследили потенциальную связь между активацией *AhR* у курильщиков с АКЛ и уровнем экспрессии *PTEN*. Данный факт требует дальнейшего изучения для выявления механизмов такой взаимосвязи.

В целом полученные результаты позволяют рассматривать PTEN как потенциальную терапевтическую мишень. В научной литературе появились данные в пользу такого предположения, так Yu с соавторами, в своих экспериментах на клеточных линиях НМРЛ и мышах показали, что потеря PTEN в клетках приводила к ускоренной пролиферации, росту клеток и потере способности к апоптозу, и, наоборот, в клеточных линиях со сверхэкспрессией PTEN отмечалось замедление образования опухолевых колоний, что также было подтверждено на экспериментальных моделях животных. Более того, в этом исследовании изучалась экспрессия интегрин $\alpha V\beta 6$, который отвечает за пролиферацию, выживание, эпителиально-мезенхимальную трансформацию, метастазирование и ангиогенез. Данный маркер часто сверхэкспрессирован при раке легкого и связан с худшими показателями безрецидивной выживаемости. Исследователи подтвердили, что эктопическая экспрессия PTEN подавляет обе белковые субъединицы интегрин $\alpha V\beta 6$, что приводит к подавлению метастазирования. Таким образом, посттранскрипционные изменения экспрессии PTEN могут рассматриваться как инновационный и многообещающий подход в лечении рака легкого [375].

В контексте проведенного нами анализа регуляции генов-мишеней AhR (*микроРНК*, *PD-L1*), а также экспрессии *PTEN* вызывает интерес недавний систематический обзор таргетных агентов в лечении НМРЛ. Помимо уже хорошо изученных мишеней для АКЛ, таких как EGFR, ALK, ROS1, BRAF, в этом обзоре упоминается и про сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR, активация которого приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, который отрицательно контролируется PTEN. На сегодняшний день рассматриваются как терапевтические мишени мутации на разных уровнях этого сигнального пути, наиболее часто мутации mTOR и АКТ, которые показывают очень скромные результаты лечения. При этом сам PTEN практически не упоминается как точка приложения для лечения НМРЛ, поэтому поиск возможных путей изменения экспрессии *PTEN* с последующим блоком каскада PI3K/АКТ/mTOR остается перспективным направлением современной онкологии [105, 366]. Например,

группой китайских ученых, как и в нашем случае, изучалась возможность воздействия на экспрессию PTEN через микроРНК [205]. В этой работе с помощью БИ анализа отобрана микроРНК-92а, повышение экспрессии которой приводит к подавлению PTEN. В исследовании доказано, что уровень этой микроРНК повышен в опухоли легкого по сравнению с неизменной легочной тканью, и достоверно коррелируют с неблагоприятным прогнозом, что связано с более частым возникновением метастазирования через эпителиально-мезенхимальную трансформацию посредством активации пути PI3K/AKT/mTOR. Подавление активности микроРНК-92а на клеточных линиях приводило к активации PTEN и подавлению роста опухолевых клеток [205].

В целом в научной литературе заметно вырос интерес к изучению регуляции PTEN через микроРНК. В последние годы активно изучается микроРНК-21, -106а-, -4286, -4299 в канцерогенезе рака легкого через подавление экспрессии PTEN, что связано с метастазированием, пролиферацией, инвазией и миграцией клеток, а также с химио- и радиорезистентностью [202, 204, 208, 374].

На основании проведенного исследования мы систематизировали наиболее значимые молекулярные маркеры, вовлеченные в канцерогенез легкого (Таблица 50).

Таблица 50 – Статистически значимые изменения изучаемых молекулярных маркеров в образцах опухолевой ткани немелкоклеточного рака легкого у курящих и некурящих пациентов при $p < 0,05$ (miR – микроРНК; M_{AhR} – медианное значение экспрессии *AhR*)

| Изменение экспрессии miRs | | | |
|---------------------------|---------------------------------------|--|--|
| Гистотип и статус курения | Экспрессия miRs | Экспрессия miRs при PD-L1>50 % в соотношении с 0 % | Экспрессия miRs при AhR ($\geq M_{AhR}$) в соотношении с AhR ($< M_{AhR}$) |
| ПКРЛ курильщики | miR-342, -181a↓ | miR-93, -155↑ | miR-93↓ |
| АКЛ курильщики | miR-342, -181a↓ miR-21, -93, -155↑ | miR-21, -146a↑ | miR-21, -342, -155↑ |
| АКЛ некурящие | miR-21, -93, -155↑ | Не исследовались | miR-342, -155↓ |

Продолжение таблицы 50

| Изменение экспрессии <i>PTEN</i> | | |
|----------------------------------|------------------------|---|
| Гистотип и статус курения | Экспрессия <i>PTEN</i> | Экспрессия <i>PTEN</i> при AhR ($\geq M_{AhR}$) в соотношении с AhR ($< M_{AhR}$) |
| ПКРЛ курильщики | не менялась | не менялась |
| АКЛ курильщики | ↓ в 5 раз | ↑ в 6 раз |
| АКЛ некурящие | ↓ в 5 раз | ↑ в 3 раза |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не смотря на достигнутый прогресс в диагностике и лечении НМРЛ, связанный с развитием молекулярно-биологических подходов и таргетной терапии, многие проблемы, в частности низкая выживаемость пациентов, остаются нерешенными. В нашем исследовании мы поставили цель не только проанализировать текущее состояние проблемы в НСО, но и провести молекулярно-генетические исследования для поиска новых маркеров, что позволило бы улучшить показатели выживаемости.

Для достижения этой цели мы применили комплексный подход. Проведен масштабный эпидемиологический анализ выживаемости 6 056 пациентов с НМРЛ в НСО в зависимости от гистотипа, возраста, стадии, пола и статуса курения. Это позволило получить более детальное ранжирование выживаемости по каждому оцениваемому параметру, что выявило закономерности не только по классическим параметрам, таким как возраст и стадии, но и позволило получить различия в выживаемости у мужчин и женщин в зависимости от гистотипа НМРЛ. Наиболее интересные данные получены в отношении влияния длительного курения, причем этот фактор по-разному влиял на пациентов с АКЛ и ПКРЛ. Курение, как основной патогенетический фактор при ПКРЛ, ухудшало общую выживаемость в 1,92 раза, тогда как при АКЛ – в 1,32 раза.

С целью поиска новых маркеров НМРЛ был проведен анализ TCGA для выявления потенциальных AhR-зависимых генов-мишеней у человека. Интересно, что проведенный анализ показал, что экспрессия самого *AhR* достоверно снижена в опухолевой ткани ПКРЛ в 1,45 раза по сравнению с нормальной тканью легкого, тогда как в АКЛ достоверных различий не выявлено. Результаты, выявившие снижение экспрессии гена *AhR* в ПКРЛ, можно объяснить недавними исследованиями, показавшими, что промотор гена *AhRR* (репрессор *AhR*) гипометилирован у курильщиков, что предполагает ингибирование рецептора. Кроме того, биоинформатический анализ также показал, что экспрессия «классических» генов-мишеней *AhR* (*CYP1A1*, *CYP1A2* и *CYP1B1*)

снижена в опухолевой ткани как ПКРЛ, так и АКЛ. На примере анализа нашей выборки пациентов получена иная картина: для ПКРЛ экспрессия *CYP1A1* присутствовала в основном в опухолевых образцах, тогда как для АКЛ курильщиков экспрессия *CYP1A1* в 63 % случаев присутствовала в условно-нормальной ткани легкого, что подтверждает классический путь активации AhR. Ряд зарубежных лабораторий продемонстрировали, что ген *CD274*, кодирующий белок PD-L1, является геном-мишенью AhR, в связи с этим мы провели анализ базы UALCAN для оценки изменения уровня экспрессии гена *CD274* в опухолевых тканях НМРЛ по сравнению с нормой. Результаты показали, что экспрессия гена *CD274* была достоверно снижена (почти в 3 раза) по сравнению с нормальной тканью. Это хорошо согласуется со снижением экспрессии *AhR* и гипометилирования его супрессора.

Исходя из данных ChIP-seq анализа, для НМРЛ были выбраны микроРНК, в промоторных областях которых имеются сайты связывания AhR (микроРНК-181a, -21, -342, -93, -146a) и PD-L1-регулирующие микроРНК (-181a, -146a, -155), а также, по данным TCGA с использованием модуля LinkFinder базы данных LinkedOmics и TargetScanHuman 7.2, идентифицирована микроРНК, геном-мишенью которой является *PTEN* (микроРНК 301a-3p, -21, -93, -181a, -155). На основании этих сведений исследованы изменения экспрессии этих микроРНК в различных типах НМРЛ с учетом статуса курения. Для дифференцированного анализа НМРЛ были сформированы группы пациентов: ПКРЛ курильщики, АКЛ некурящие и АКЛ курильщики. Для этих групп была определена экспрессия AhR-регулируемых микроРНК и микроРНК, регулирующих PD-L1, на биокolleкции образцов опухолевой и прилежащей условно-нормальной ткани легкого (в каждой группе взято по 40 образцов), охарактеризованных по экспрессии PD-L1 на основании данных ИГХ. Показатели уровня микроРНК имели широкие вариации значений среди выделенных групп пациентов. Отмечалось как повышение уровня экспрессии некоторых микроРНК, что свидетельствует о классическом AhR-опосредованном механизме активации AhR лигандом (БП), так и снижение экспрессии, что говорит о гетерогенности опухоли и разных нелинейных

механизмах канцерогенеза легкого и активации AhR-независимых механизмов. Эти данные также подтвердили полученные результаты по оценке связи высокой экспрессии *AhR* с уровнем экспрессии микроРНК. Интересно, что у пациентов курильщиков с АКЛ были выявлены микроРНК, с большой вероятностью вовлеченные в канцерогенез легкого, так уровень экспрессии микроРНК-21, -342, -155 возрастал в 2 раза при высоком уровне экспрессии *AhR*, что вновь подтверждает классический путь активации AhR. Экспрессия других микроРНК (микроРНК-342, -181a, -93) снижалась у пациентов курильщиков, что с одной стороны можно трактовать как AhR-независимый механизм канцерогенеза, а с другой стороны нельзя исключать роли AhR в этом процессе, т. к. курение может вызывать гипометилирование AhRR, что приводит к снижению активности рецептора и, следовательно, к негативной регуляции микроРНК. С другой стороны изучаемые микроРНК могут находиться под контролем других генов, и в данной ситуации их регуляция более сложна. У некурящих пациентов с АКЛ такие взаимосвязи были выявлены в меньшей степени. С учетом того, что повышенная экспрессия PD-L1 в опухоли связана в основном с курением, мы сопоставили исследуемые нами микроРНК у курильщиков с АКЛ и с ПКРЛ с уровнем PD-L1. Оказалось, что повышение уровня экспрессии микроРНК-91, -155, -21, -146 связано с высоким уровнем PD-L1, что повышает диагностическую ценность изучаемых нами микроРНК. Более того, для определения потенциальной клинической пользы исследуемых микроРНК мы сопоставили уровень их экспрессии с клинико-патологическими характеристиками пациентов. Результаты показали достоверное снижение AhR-регулируемой микроРНК-93 в 3 раза у пациентов старше 67 лет. Экспрессия PD-L1-регулирующих микроРНК-181a и -155 была снижена в опухолях большего размера (с увеличением T-стадии уровень данных микроРНК уменьшался в 2 и 4 раза соответственно), а у пациентов с метастазами в лимфоузлах в группах N1–N3 уровни экспрессии микроРНК-181a и -155 снижались в 2 и 3 раза соответственно по сравнению с группой N0. Таким образом, микроРНК-181a и -155 могут быть потенциальными

маркерами плохого прогноза, так как снижение их экспрессии связано с более распространенной стадией рака легкого.

При изучении генов-мишеней исследуемых микроРНК с целью дальнейшего поиска новых маркеров НМРЛ наш интерес был сконцентрирован на гене *PTEN* (ген онкосупрессор), который опосредует активацию АКТ, тем самым отрицательно регулируя сигнальный путь PI3K-АКТ-mTOR и приводя к остановке клеточного цикла в фазе G1 и апоптозу. Результаты биоинформатического анализа показали, что *PTEN* может регулироваться изучаемыми нами микроРНК-21, -93, -181a, -155, -301a. Анализ *in silico* выявил, что уровень *PTEN* снижается в опухолевых тканях как пациентов с ПКРЛ, так и пациентов с АКЛ. Однако при распределении образцов по статусу курения было обнаружено, что курение вызывает достоверное снижение уровня мРНК *PTEN* только у пациентов с ПКРЛ, в то время как в опухолевых тканях АКЛ курение не оказывало достоверного влияния на экспрессию *PTEN*. Полученные результаты могут свидетельствовать о разных механизмах канцерогенеза в этих гистологических подтипах РЛ.

Полученные при биоинформатическом анализе данные требуют экспериментального подтверждения с образцами тканей, в связи с чем мы провели серию измерений на образцах опухолей ПКРЛ и АКЛ, полученных от пациентов. Результаты показали классическую отрицательную корреляцию с экспрессией *PTEN* для микроРНК-155 у некурящих пациентов с АКЛ. Наибольший интерес вызвала положительная корреляция микроРНК-93 у пациентов курильщиков с АКЛ, что может соответствовать стабилизации *PTEN* под контролем этой микроРНК. Данный факт является перспективным для рассмотрения совершенно новых подходов как в диагностике, так и в лечении НМРЛ. Для выборки клинических образцов с ПКРЛ была исследована экспрессия микроРНК-301a-3p и ее связь с экспрессией *PTEN*, т. к. биоинформатический анализ показал значимую отрицательную корреляцию этих генов. Так при сравнении уровней мРНК *PTEN* в образцах опухолевой ткани с образцами прилегающей ткани легкого было выявлено значимое ($p = 0,047$) снижение

медианного значения ее уровня в опухоли в 1,37 раза. В свою очередь, при анализе в этих же образцах уровня микроРНК-301а-3р было обнаружено увеличение медианы в 19 раз ($p = 0,0013$). Таким образом, идентифицированы несколько микроРНК для разных подтипов НМРЛ с разными механизмами регуляции PTEN, что еще раз подтверждает возможные различия в канцерогенезе АКЛ и ПКРЛ.

Для изучения гендерных особенностей в канцерогенезе легкого мы провели эксперимент на животных. За основу нашей работы был взят арил-углеводородный рецептор (AhR), так как из научной литературы известно, что он активируется бензо(а)пиреном (основной канцероген табачного дыма), и, следовательно, изучение его генов-мишеней позволяет выявить новые молекулярные маркеры. При внутрибрюшинном введении БП крысам была доказана активация AhR по средствам изменения экспрессии его «классических» генов-мишеней цитохромов P450 (CYP) первого семейства CYP1A/B. Мы увидели повышение экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1* как при однократном, так и при хроническом воздействии БП по сравнению с контролем, что определяло активацию AhR. Затем, учитывая, что AhR может регулировать некоторые микроРНК, с помощью БИ анализа были отобраны четыре микроРНК -22-3р, -29а-3р, -193b-5р, -483-3р, в промоторах генов которых или их генов-хозяев были обнаружены сайты связывания с AhR. Наибольший интерес представляют результаты, полученные при хроническом воздействии бензо(а)пирена, т.к. это максимально моделирует хроническое воздействие табачного дыма у человека. При этом получен интересный факт гендерного различия в экспрессии исследуемых микроРНК. У самцов обнаружено статистически значимое повышение уровня всех 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, что возможно связано с одной стороны ко-экспрессией ER и AhR, а с другой стороны подтверждает вероятное существование гендерных различий в канцерогенезе легкого.

В целом проведенное нами исследование подтвердило высокий процент курильщиков среди НМРЛ – для ПКРЛ этот показатель достигает 87,89 % и 64,02 % для АКЛ, – что требует новых подходов к лечению таких пациентов с учетом статуса курения, так как у них, согласно данным TCGA меняется биология опухоли. Нам удалось выявить ряд специфичных микроРНК, экспрессия которых различается для ПКРЛ и АКЛ, которые могут быть потенциальными маркерами данных заболеваний. Более того, этот показатель различается для опухолей с разной экспрессией PD-L1. Важным результатом проведенного исследования является выяснение роли онкосупрессора PTEN, экспрессия которого, как оказалось, 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 ингибиторов киназных путей (PI3K, АКТ, mTOR).

На основании выполненной работы был разработан потенциальный алгоритм диагностики и лечения ПКРЛ и АКЛ (Приложения А и Б), также определена гипотетическая схема разных механизмов канцерогенеза легкого (Рисунок 71).

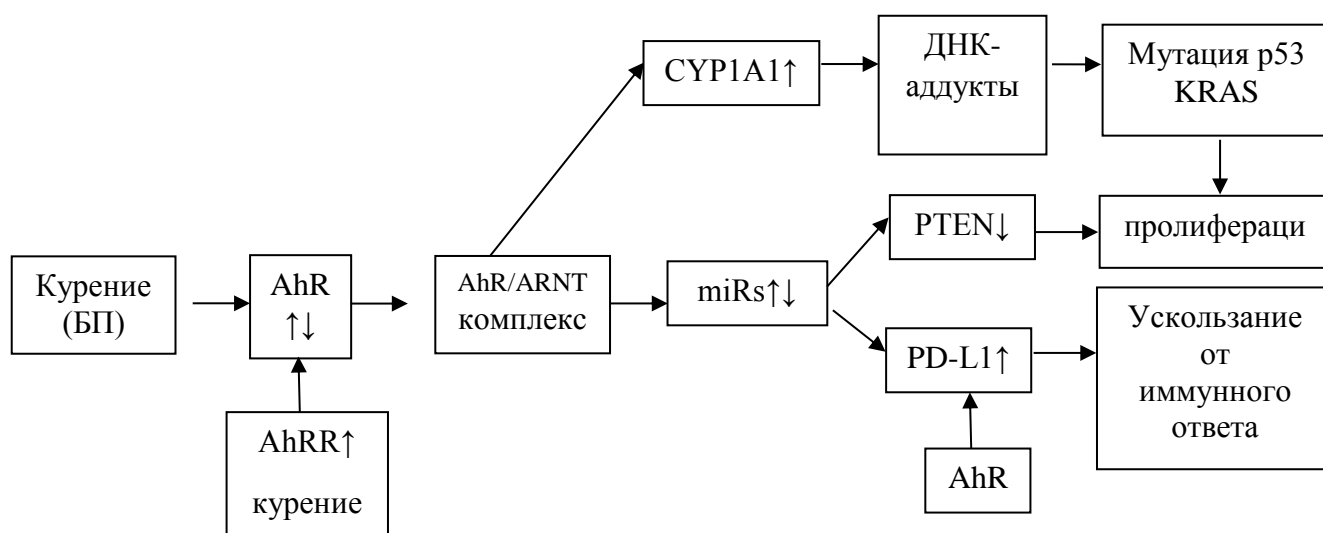


Рисунок 71 – Гипотетическая схема классического генотоксического и эпигенетического механизма канцерогенеза легкого

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 необходимо проводить дополнительную оценку молекулярных маркеров у пациентов с плоскоклеточным раком легкого с определением уровня микроРНК-181a, -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, -146a 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

| | |
|--------|---|
| АКЛ | аденокарцинома легкого |
| АПК | антигенпрезентирующая клетка |
| БАР | бронхиолоальвеолярный рак легкого |
| БИ | биоинформатика |
| БП | бензо(а)пирен |
| ВБП | выживаемость без прогрессирования |
| ГАУ | галогенированные ароматические углеводороды |
| ДК | дендритная клетка |
| ИГХ | иммуногистохимическое исследование |
| ИЛ | интерлейкин |
| ИТК | ингибиторы тирозинкиназы |
| ИФА | иммунофлюоресцентный анализ |
| НДКТ | низкодозовая компьютерная томография |
| НМРЛ | немелкоклеточный рак легкого |
| НСО | Новосибирская область |
| ОВ | общая выживаемость |
| ПАУ | полиароматические углеводороды |
| ПКРЛ | плоскоклеточный рак легкого |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| РЛ | рак легкого |
| ТЧ | твердые частицы |
| ХОБЛ | хроническая обструктивная болезнь легких |
| AhR | арил-углеводородный рецептор |
| AIS | аденокарцинома <i>in situ</i> |
| AR | андрогеновый рецептор |
| ARE | антиоксидант-ответственный элемент |
| ARNT | ядерный переносчик арил-углеводородного рецептора |
| CYP1A1 | цитохром P450, семейство 1, подсемейство A |

| | |
|----------------|--|
| CYP1B1 | цитохром P450, семейство 1, подсемейство B |
| EMP2 | эпителиальный мембранный белок 2 |
| EMT | эпителиально-мезенхимальный переход |
| IGF1 | инсулиноподобный фактор роста 1 |
| IGF2 | инсулиноподобный фактор роста 2 |
| ITGA6 | интегрин $\alpha 6$ |
| Keap1 | Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 |
| KLF6 | Krüppel-подобный фактор 6 |
| MIA | минимально инвазивная аденокарцинома |
| miR | микроРНК |
| NF- κ B | ядерный фактор Каппа B |
| Nrf2 | фактор-2, связанный с эритроидным ядерным фактором |
| PD-1 | рецептор программированной смерти 1 |
| PD-L1 | лиганд рецептора программированной смерти 1 |
| PI3K | фосфоинозитол 3 киназный путь |
| PTEN | онкосупрессор гомолог тензина и фосфотазы |
| SLC34A2 | ген, кодирующий натрий зависимый транспортный белок 2В фосфатов |
| TCGA | The Cancer Genome Atlas |
| TPS | соотношения опухолевых клеток с позитивным окрашиванием мембраны к общему количеству опухолевых клеток |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние бенз(а)пирена и эндогенного агониста арил-гидрокарбонового рецептора FICZ на активацию транскрипционного фактора NF-κB и цитокиновый секретом в клетках гепатомы человека линии HeraRG / В. Н. Бабаков, Н. Ю. Роговская, И. Д. Курдюков [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2018. – Т. 20 (3). – С. 432–438.
2. Влияние бенз[а]пирена на экспрессию AhR-регулируемых микроРНК в лёгких самок и самцов крыс / С. В. Филиппов, А. А. Ярушкин, А. К. Яковлева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66 (3). – С. 224–232.
3. Влияние факторов внешней среды на онкологическую заболеваемость населения Северо-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областей / С. В. Бабошкина, И. В. Горбачев, Н. В. Ларинова [и др.] // под ред. Е. Л. Чойнзонова [и др.] – Петропавловск : СКГУ им. М. Козыбаева, 2013. – 224 с.
4. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – пер. с англ. – Москва : Практика, 1998. – 459 с.
5. Давыдов, М. И. Онкология. Клинические рекомендации / М. И. Давыдов. – Москва : Издательская группа РОНЦ, 2015. – 680 с.
6. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета / В. М. Мерабишвили, А. И. Арсеньев, С. А. Тарков [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2018. – Т. 17 (6). – С. 15–26.
7. Заболеваемость раком легкого в различных городах мира (обзор) / Л. Д. Жуйкова, Е. Л. Чойнзонов, О. А. Ананина [и др.] // Вопросы онкологии. – 2020. – Т. 66, № 3. – С. 239–246.
8. Канцерогенные табакоспецифические N-нитрозамины и проблема «Безопасной сигареты» / Г. А. Белицкий, Л. В. Кривошеева, И. А. Хитрово [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2010. – Т. 21, № 2. – С. 3–9.
9. Каприна, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ

«НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 252 с.

10. Каприна, А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. / А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 239 с.

11. Кошечкин, В. А. Фтизиатрия: учебник / В. А. Кошечкин. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 304 с.

12. Лактионов, К. К. Опухоли внутригрудной локализации / К. К. Лактионов, М. М. Давыдов. – Москва : ГРАНАТ, 2018. – 128 с.

13. Обзор состояния окружающей среды в городе Новосибирске за 2017 год. – Новосибирск : Издательство Гарамонд, 2017. – 100 с.

14. Поддубная, И. В. Онкология: справочник практического врача / И. В. Поддубная. – Москва : МЕДпресс-информ, 2009. – 768 с.

15. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2000. – 312 с.

16. Роль интратуморальных дендритных клеток в прогрессировании плоскоклеточных карцином / Л. Н. Бондарь, Л. А. Таширева, О. В. Савенкова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18, № 4. – С. 50–58.

17. Статистические методы анализа в клинической практике. Часть. 2. Анализ выживаемости и многомерная статистика / П. О. Румянцев, В. А. Саенко, У. В. Румянцева, С. Ю. Чекин // Проблемы Эндокринологии. – 2009. – Т. 55, № 6. – С. 48–56.

18. Трахтенберг, А. Х. Рак легкого: руководство, атлас / А. Х. Трахтенберг, В. И. Чиссов. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 656 с.

19. A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes / I. Rodríguez-Escudero, M. D. Oliver, A. Andrés-Pons [et al.] // Hum Mol Genet. – 2011. – V. 20 (21). – P. 4132–42. DOI: 10.1093/hmg/ddr337

20. A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity

/ B. Maier, A. M. Leader, S. T. Chen [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 580 (7802). – P. 257–262. DOI: 10.1038/s41586-020-2134-y.

21. A long-term follow-up study of mortality in transsexuals receiving treatment with cross-sex hormones / H. Asscheman, E. J. Giltay, J. A. Megens [et al.] // *Eur J Endocrinol*. – 2011. – V. 164. – P. 635–642. DOI: 10.1530/EJE-10-1038.

22. A polycyclic aromatic hydrocarbon-enriched environmental chemical mixture enhances AhR, antiapoptotic signaling and a proliferative phenotype in breast cancer cells / L. M. Gearhart-Serna, J. B. Davis, M. K. Jolly [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2020. – V. 41. – P. 1648–1659. DOI: 10.1093/carcin/bgaa047.

23. A unique set of 6 circulating microRNAs for early detection of non-small cell lung cancer / A. R. Halvorsen, M. Bjaanæs, M. LeBlanc [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7 (24). – P. 37250–37259. DOI: 10.18632/oncotarget.9363.

24. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain / W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi [et al.] // *PLoS Med*. – 2005. – Vol. 2 (3). – P. 73. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020073.

25. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib / T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella [et al.] // *N Engl J Med*. – 2004. – V. 350 (21). – P. 2129–2139. DOI: 10.1056/NEJMoa040938.

26. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Leads to Resistance to EGFR TKIs in Non-Small Cell Lung Cancer by Activating Src-mediated Bypass Signaling / M. Ye, Y. Zhang, H. Gao [et al.] // *Clin. Cancer Res*. – 2018. – V. 24. – P. 1227–1239. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0396

27. Adrain, C. Regulation of receptor tyrosine kinase ligand processing / C. Adrain, M. Freeman // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. – 2014. – V. 6 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a008995.

28. Afatinib and Cetuximab in Four Patients With EGFR Exon 20 Insertion-Positive Advanced NSCLC / B. V. Veggel, A. J. D. Langen, S. M. Hashemi [et al.] // *J. Thoracic Oncol*. – 2018. – V. 13. – P. 1222–1226. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.04.012.

29. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial / Y.-L. Wu, C. Zhou, C.-P. Hu [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2014. – V. 15 (2). – P. 213–222. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70604-1.
30. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials / J. C. Yang, Y. L. Wu, M. Schuler [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2015. – V. 16 (2). – P. 141–151. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71173-8.
31. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial / K. Park, E. H. Tan, K. O'Byrne [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2016. – V. 17 (5). – P. 577–589. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30033-X.
32. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial / L. Paz-Ares, E. H. Tan, K. O'Byrne [et al.] // *Ann Oncol.* – 2017. – V. 28 (2). – P. 270–277. DOI: 10.1093/annonc/mdw611.
33. Affiliations expand A comprehensive review of uncommon EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer / H.-Y. Tu, E.-E. Ke, J.-J. Yang [et al.] // *Lung Cancer.* – 2017. – V. 114. – P. 96–102. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.11.005.
34. AhR ligand Aminoflavone inhibits $\alpha 6$ -integrin expression and breast cancer sphere-initiating capacity / E. Brantley, M. Callero, D. Berardi [et al.] // *Cancer Lett.* – 2016. – V. 376 (1). – P. 53–61. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.025.
35. AhR signaling pathways and regulatory functions / L. Larigot, L. Juricek, J. Dairou, X. Coumoul // *Biochim Open.* – 2018. – V. 7. – P. 1–9. DOI: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.
36. AhR-mediated changes in global gene expression in rat liver progenitor cells / D. Faust, J. Vondráček, P. Krčmář [et al.] // *Arch Toxicol.* – 2013. – V. 87 (4). –

P. 681–98. DOI: 10.1007/s00204-012-0979-z.

37. AHRR (cg05575921) hypomethylation marks smoking behaviour, morbidity and mortality / S. E. Bojesen, N. Timpson, C. Relton [et al.] // *Thorax*. – 2017. – V. 72 (7). – P. 646–653. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2016-208789.

38. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of cohorts for air pollution effects (ESCAPE) / O. Raaschou-Nielsen, Z. J. Andersen, R. Beelen [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2013. – V. 14 (9). – P. 813–822. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70279-1.

39. Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems / D. E. Schraufnagel, J. R. Balmes, C. T. Cowl [et al.] // *Chest*. – 2019. – V. 155 (2). – P. 417–426. DOI: 10.1016/j.chest.2018.10.041.

40. Alexandrov, K. The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation / K. Alexandrov, M. Rojas, S. Satarug // *Toxicol Lett.* – 2010. – V. 198 (1). – P. 63–68. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.04.009.

41. Alterations of INPP4B, PIK3CA and pAkt of the PI3K pathway are associated with squamous cell carcinoma of the lung / A. Stjernstrom, C. Karlsson, O. J. Fernandez [et al.] // *Cancer Med.* – 2014. – V. 3. – P. 337–348. DOI: 10.1002/cam4.191.

42. An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway / G. Tsuji, M. Takahara, H. Uchi [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2011. – V. 62. – P. 42–49. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.10.017.

43. Appraising MicroRNA-155 as a Noninvasive Diagnostic Biomarker for Cancer Detection: A Meta-Analysis / Y. Hou, J. Wang, X. Wang [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – V. 95 (2). – P. 2450. DOI: 10.1097/MD.0000000000002450.

44. Aromatic hydrocarbon receptors in mitochondrial biogenesis and function / A. Sahebnaasagh, J. Hashemi, A. Khoshi [et al.] // *Mitochondrion*. – 2021. – V. 61. – P. 85–101. DOI: 10.1016/j.mito.2021.09.012.

45. Arteaga, C. L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? / C. L. Arteaga // *Oncologist*. – 2002. – V. 7 (4). – P. 31–39. DOI: 10.1634/theoncologist.7-suppl_4-31.
46. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent regulation of pulmonary miRNA by chronic cigarette smoke exposure / S. Rogers, A. R. de Souza, M. Zago [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 40539. DOI: 10.1038/srep40539.
47. Aryl hydrocarbon receptor agonists induce microRNA-335 expression and inhibit lung metastasis of estrogen receptor negative breast cancer cells / S. Zhang, K. H. Kim, U. H. Jin [et al.] // *Mol Cancer Ther.* – 2012. – V. 11 (1). – P. 108–118. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0548.
48. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer / J. J. Tsay, K. M. Tchou-Wong, A. K. Greenberg [et al.] // *Anticancer Res.* – 2013. – V. 33 (4). – P. 1247–56.
49. Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates NADPH Oxidase Activity via Direct Transcriptional Regulation of p40(phox) Expression / T. Wada, H. Sunaga, R. Ohkawara, S. Shimba // *Mol. Pharmacol.* – 2013. – V. 83. – P. 1133–1140. DOI: 10.1124/mol.112.083303.
50. Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4 / M. A. Bar Hoover, J. M. Hall, W. F. Greenlee [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – V. 77. – P. 195–201. DOI: 10.1124/mol.109.059675.
51. Bade, B. C. Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention / B. C. Bade, C. S. Dela Cruz // *Clin Chest Med.* – 2020. – V. 41 (1). – P. 1–24. DOI: 10.1016/j.ccm.2019.10.001.
52. Bae, J. M. Hormonal Replacement Therapy and the Risk of Lung Cancer in Women: An Adaptive Meta-analysis of Cohort Studies / J. M. Bae, E. H. Kim // *J Prev Med Public Health.* – 2015. – V. 48. – P. 280–286. DOI: 10.3961/jpmph.15.054.
53. Barta, J. A. Global Epidemiology of Lung Cancer / J. A. Barta, C. A. Powell, J. P. Wisnivesky // *Ann Glob Health.* – 2019. – V. 85 (1). – P. 8. DOI: 10.5334/aogh.2419.
54. Benbrahim, Z. EGFR mutation frequency in Middle East and African non-

small cell lung cancer patients: a systematic review and meta-analysis / Z. Benbrahim, T. Antonia, N. Mellas // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18 (1). – P. 891. DOI: 10.1186/s12885-018-4774-y

55. Bock, K. W. Aryl hydrocarbon receptor (AHR): From selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions / K. W. Bock // *Biochem. Pharmacol.* – 2019. – V. 168. – P. 65–70. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.06.015.

56. Bollinger, M. K. Osimertinib: A third-generation tyrosine kinase inhibitor for treatment of epidermal growth factor receptor-mutated non-small cell lung cancer with the acquired Thr790Met mutation / M. K. Bollinger, A. S. Agnew, G. P. Mascara // *J. Oncol. Pharm. Pract.* – 2018. – V. 24 (5). – P. 379–388. DOI: 10.1177/1078155217712401.

57. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer / N. A. Rizvi, M. D. Hellmann, A. Snyder [et al.] // *Science*. – 2015. – V. 348. – P. 124–128. DOI: 10.1126/science.aaa1348.

58. Cancer in the very young: treatment and survival in the national cancer data bas / B. N. Arnold, D. C. Thomas, J. E. Rosen [et al.] // *J Thorac Oncol.* – 2016. – V. 11. – P. 1121–1131.

59. Castellanos, E. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer / E. Castellanos, E. Feld, L. Horn // *J Thorac Oncol.* – 2017. – V. 12 (4). – P. 612–623. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.12.014.

60. Cell-Free miR-17-5p as a Diagnostic Biomarker for Gastric Cancer Inhibits Dendritic Cell Maturation / Z. Cui, X. Xie, W. Qi [et al.] // *Onco Targets Ther.* – 2019. – V. 12. – P. 2661–2675. DOI: 10.2147/OTT.S197682.

61. Characteristics of COPD in never-smokers and ever-smokers in the general population: Results from the CanCOLD study / W. C. Tan, D. D. Sin, J. Bourbeau [et al.] // *Thorax*. – 2015. – V. 70. – P. 822–829. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-206938.

62. Chemical composition and bioreactivity of PM_{2.5} during 2013 haze

events in china / K. F. Ho, S. S. H. Ho, R. J. Huang [et al.] // *Atmos Environ.* – 2016. – V. 126. – P. 162–170. DOI: 10.1007/s11356-021-16552-0.

63. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo / R. Shaykhiev, F. Otaki, P. Bonsu [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – V. 68 (5). – P. 877–892. DOI: 10.1007/s00018-010-0500-x.

64. Circulating exosomal microRNAs as prognostic biomarkers for non-small-cell lung cancer / Q. Liu, Z. Yu, S. Yuan [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8 (8). – P.13048–13058. DOI: 10.18632/oncotarget.14369.

65. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations / N. Rekhtman, P. K. Paik, M. E. Arcila [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – V. 18 (4). – P. 1167–1176. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2109.

66. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6 / J. C. Yang, L. V. Sequist, S. L. Geater [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2015. – V. 16 (7). – P. 830–838. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00026-1.

67. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers / H. Shigematsu, L. Lin, T. Takahashi [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – V. 97 (5). – P. 339–346. DOI: 10.1093/jnci/dji055.

68. Clinical and molecular characteristics of non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring EGFR mutation: results of the nationwide French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) program / C. Leduc, J. P. Merlio, B. Besse [et al.] // *Ann Oncol.* – 2017. – V. 28 (11). – P. 2715–2724. DOI: 10.1093/annonc/mdx404.

69. Clinical definition of acquired resistance to immunotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer / A. J. Schoenfeld, S. J. Antonia, M. M. Awad [et al.] // *Ann Oncol.* – 2021. – V. 32 (12). – P. 1597–1607. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.2151.

70. Clinical features and treatment outcome of non-small cell lung cancer

(NSCLC) patients with uncommon or complex epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations / S. Frega, M. Lorenzi, M. Fassan [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8 (20). – P. 32626–32638. DOI: 10.18632/oncotarget.15945.

71. Clinical Implication of Smoking-Related Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor (AHRR) Hypomethylation in Japanese Adults / F. Takeuchi, K. Takano, M. Yamamoto [et al.] // *Circ J*. – 2022. – V. 86 (6). – P. 986–992. DOI: 10.1253/circj.CJ-21-0958.

72. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy / P. Bonaventura, T. Shekarian, V. Alcazer [et al.] // *Front Immunol*. – 2019. – V. 10. – P. 168. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00168.

73. Combined Effect of Metastasis-Related MicroRNA, miR-34 and miR-124 Family, Methylation on Prognosis of Non-Small-Cell Lung Cancer / Y. H. Kim, W. K. Lee, E. B. Lee [et al.] // *Clin Lung Cancer*. – 2017. – V. 18. – P. 13–20. DOI: 10.1016/j.clcc.2016.06.005.

74. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences / Y. V. Sun, D. R. Boverhof, L. D. Burgoon [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2004. – V. 32 (15). – P. 4512–4523. DOI: 10.1093/nar/gkh782.

75. Comparing the effects of afatinib with gefitinib or Erlotinib in patients with advanced-stage lung adenocarcinoma harboring non-classical epidermal growth factor receptor mutations / Y.-C. Shen, G.-C. Tseng, C.-Y. Tu [et al.] // *Lung Cancer*. – 2017. – V. 110. – P. 56–62. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.06.007.

76. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group / J. H. Schiller, D. Harrington, C. P. Belani [et al.] // *N Engl J Med*. – 2002. – Vol. 346 (2). – P. 92–98. DOI: 10.1056/NEJMoa011954

77. Cooperation of structurally different aryl hydrocarbon receptor agonists and β -catenin in the regulation of CYP1A expression / S. Vaas, L. Kreft, M. Schwarz, A. Braeuning // *Toxicology*. – 2014. – V. 325. – P. 31–41. DOI: 10.1016/j.tox.2014.08.010.

78. Cost-minimization analysis for Portugal of five doublet chemotherapy

regimens from two phase III trials in the treatment of advanced non-small cell lung cancer / F. L. Pimentel, S. Bhalla, L. Laranjeira, M. Guerreiro. // *Lung Cancer*. – 2006. – Vol. 52 (3). – P. 365–371. DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.03.005.

79. Courtney, K. D. The PI3K pathway as drug target in human cancer / K. D. Courtney, R. B. Corcoran, J. A. Engelman // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – V. 28. – P. 1075–1083. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.3641.

80. CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study / C. S. Jose, A. Cabanillas, J. Benitez [et al.] // *BMC Cancer*. – 2010. – V. 10. – P. 463. DOI: 10.1186/1471-2407-10-463.

81. CYP1A2 genetic polymorphisms and adenocarcinoma lung cancer risk in the Tunisian population / F. B'chir, S. Pavanello, J. Knani [et al.] // *Life Sci*. – 2009. – V. 84 (21-22). – P. 779–784. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.03.008.

82. CYP2A6 genetic polymorphisms and biomarkers of tobacco smoke constituents in relation to risk of lung cancer in the Singapore Chinese Health Study / J.M. Yuan, H. H. Nelson, S. G. Carmella [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2017. – V. 38 (4). – P. 411–418. DOI: 10.1093/carcin/bgx012.

83. Czech, B. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes / B. Czech, G. J. Hannon // *Nat Rev Genet*. – 2011. – V. 12 (1). – P. 19–31. DOI: 10.1038/nrg2916.

84. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial / Y.-L. Wu, Y. Cheng, X. Zhou [et al.] // *Lancet Oncol*. – 2017. – V. 18 (11). – P. 1454–1466. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30608-3.

85. de Matteis, S. Are Women Who Smoke at Higher Risk for Lung Cancer Than Men Who Smoke? / S. de Matteis, D. Consonni, A.C. Pesatori, et al. // *Am J Epidemiol*. – 2013. – V. 177(7). – P. 601–612.

86. Dela Cruz, C. S. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention / C. S. Dela Cruz, L. T. Tanoue, R. A. Matthay // *Clin Chest Med*. – 2011. – V. 32 (4). – P. 1–61. DOI: 10.1016/j.ccm.2011.09.001.

87. Dendritic cell subsets / C. Macri, E. S. Pang, T. Patton, M. O'Keeffe //

Semin Cell Dev Biol. – 2018. – V. 84. – P. 11–21. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.12.009.

88. Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Lung Cancer / D. Stevens, J. Ingels, S. Van Lint [et al.] // Front Immunol. – 2021. – V. 11. – P. 620374. DOI: 10.3389/fimmu.2020.620374.

89. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy / S. K. Wculek, F. J. Cueto, A. M. Mujal [et al.] // Nat Rev Immunol. – 2020. – V. 20 (1). – P. 7–24. DOI: 10.1038/s41577-019-0210-z.

90. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients / D. Ryberg, A. Hewer, D. H. Phillips, A. Haugen // Cancer Res. – 1994. – V. 54. – P. 5801–5803.

91. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants / D. Schwarz, P. Kisselev, I. Cascorbi [et al.] // Carcinogenesis. – 2001. – V. 22 (3). – P. 453–459. DOI: 10.1093/carcin/22.3.453.

92. Discovery and function exploration of microRNA-155 as a molecular biomarker for early detection of breast cancer / X. Liu, Q. Chang, H. Wang [et al.] // Breast Cancer. – 2021. – V. 28 (4). – P. 806–821. DOI: 10.1007/s12282-021-01215-2.

93. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade / S. C. Wei, J. H. Levine, A. P. Cogdill [et al.] // Cell. – 2017. – V. 170 (6). – P. 1120–1133. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.024.

94. Divergent epidermal growth factor receptor mutation patterns between smokers and non-smokers with lung adenocarcinoma / J. S. Tseng, C. L. Wang, T. Y. Yang [et al.] // Lung Cancer. – 2015. – V. 90 (3). – P. 472–476. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.09.024.

95. Down-regulation of microRNA-26b modulates non-small cell lung cancer cells chemoresistance and migration through the association of PTEN / N. Liang, X. Zhou, M. Zhao [et al.] // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. – 2015. – V. 47 (7). – P. 530–538. DOI: 10.1093/abbs/gmv046.

96. Doyle, L. Gabriel Andral (1797-1876) and the first reports of lymphangitis carcinomatosa / L. Doyle // J R Soc Med. – 1989. – V. 82 (8). – P. 491–493. DOI:

10.1177/014107688908200814.

97. Duma, N. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment / N. Duma, R. Santana-Davila, J. R. Molina // *Mayo Clin Proc.* – 2019. – V. 94 (8). – P. 1623–1640. DOI: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013.

98. E3 ubiquitin ligases Cbl-b and c-Cbl downregulate PD-L1 in EGFR wild-type non-small cell lung cancer / S. Wang, L. Xu, X. Che [et al.] // *FEBS.* – 2018. – V. 592 (4). – P. 621–630. DOI: 10.1002/1873-3468.12985.

99. Effect of Benzo(a)pyrene on the Expression of miR-483-3p in Hepatocyte Primary Culture and Rat Liver / S. V. Filippov, A. A. Yarushkin, T. S. Kalinina [et al.] // *Biochem.* – 2019. – Vol. 84 (10). – P. 1197–1203. DOI: 10.1134/S0006297919100080.

100. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines / C. C. Bancroft, Z. Chen, J. Yeh [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2002. – Vol. 99 (4). – P. 538–548. DOI: 10.1002/ijc.10398.

101. Efficacy according to blind independent central review: Post-hoc analyses from the phase III, randomized, multicenter, IPASS study of first-line gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in Asian patients with EGFR mutation-positive advanced NSCLC / Y.-L. Wu, N. Saijo, S. Thongprasert [et al.] // *Lung Cancer.* – 2017. – Vol. 104. – P. 119–125. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.11.022.

102. EGFR mutation analysis for prospective patient selection in AURA3 phase III trial of osimertinib versus platinum-pemetrexed in patients with EGFR T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer / T. John, H. Akamatsu, A. Delmonte [et al.] // *Lung Cancer.* – 2018. – V. 126. – P. 133–138. DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.10.027.

103. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib / S. Kobayashi, T.J. Boggon, T. Dayaram [et al.] // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol. 352 (8). – P. 786-92. DOI: 10.1056/NEJMoa044238.

104. EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC

patients: data from daily practice / S. Gahr, R. Stoehr, E. Geissinger [et al.] // *J Cancer*. – 2013. – Vol. 109 (7). – P. 1821–8. DOI: 10.1038/bjc.2013.511.

105. EMP1, EMP 2, and EMP3 as novel therapeutic targets in human cancer / Y. Wang, H. Cheng, Y. Ding [et al.] // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. – 2017. – V. 1868 (1). – P. 199–211. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.04.004.

106. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: Clinical outcomes and response to erlotinib / J. Naidoo, C. S. Sima, K. Rodriguez [et al.] // *Cancer*. – 2015. – V. 121. – P. 3212–3220. DOI: 10.1002/cncr.29493.

107. Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Resistance Patterns to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Review / E.-A. Karlsen, S. Kahler, J. Tefay [et al.] // *Cells*. – 2021. – V. 10 (5). – P. 1206. DOI: 10.3390/cells10051206.

108. Epidermal growth factor receptor mutation enhances expression of vascular endothelial growth factor in lung cancer / M. S. Hung, I. C. Chen, P. Y. Lin [et al.] // *Oncol Lett*. – 2016. – V. 12. – P. 4598–4604. DOI: 10.3892/ol.2016.5287.

109. Epigenetic regulation of MAGE family in human cancer progression-DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs / Y. Lian, L. Meng, P. Ding [et al.] // *Clin Epigenet*. – 2018. – V. 10 (1). – P. 115. DOI: 10.1186/s13148-018-0550-8.

110. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study / C. Zhou, Y. L. Wu, G. Chen [et al.] // *Lancet Oncol*. – 2011. – V. 12 (8). – P. 735–742. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X.

111. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial / R. Rosell, E. Carcereny, R. Gervais [et al.] // *Lancet Oncol*. – 2012. – V. 13 (3). – P. 239–246. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.

112. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer / M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio [et al.] // *Ann Oncol.* – 2017. – V. 28. – P. 1117–1123. DOI: 10.1093/annonc/mdx033.

113. Evaluation Expression of miR-146a and miR-155 in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients / N. K. Dezfuli, S. D. Alipoor, N. D. Roofchayee [et al.] // *Front Oncol.* – 2021. – V. 11. – P. 715677. DOI: 10.3389/fonc.2021.715677.

114. Evaluation of dynamic change of serum miR-21 and miR-24 in pre- and post-operative lung carcinoma patients / H-B. Le, W-Y. Zhu, D-D. Chen [et al.] // *Med Oncol.* – 2012. – V. 29 (5). – P. 3190–3197. DOI: 10.1007/s12032-012-0303-z

115. Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer / H. Dejima, H. Iinuma, R. Kanaoka [et al.] // *Oncol Lett.* – 2017. – V. 13. – P. 1256–1263. DOI: 10.3892/ol.2017.5569.

116. Expression patterns for nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in smoking-related lung cancers / A. Bordas, J. L. Cedillo, F. Arnalich [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8 (40). – P. 67878–67890. DOI: 10.18632/oncotarget.18948.

117. Farago, A. F. Beyond *ALK* and *ROS1*: *RET*, *NTRK*, *EGFR* and *BRAF* gene rearrangements in non-small cell lung cancer / A. F. Farago, C. G. Azzoli // *Transl Lung Cancer Res.* – 2017. – Vol. 6 (5). – P. 550–559. DOI: 10.21037/tlcr.2017.08.02.

118. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study / Y.-L. Wu, C. Zhou, C. K. Liam [et al.] // 2015. – V. 26 (9). – P. 1883–1889. DOI: 10.1093/annonc/mdv270.

119. First-line treatment of advanced epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation positive non-squamous non-small cell lung cancer / J. Greenhalgh, K. Dwan, A. Boland [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2016. – Vol. 25. – P. 5. DOI: 10.1002/14651858.CD010383.pub2.

120. Flaming the fight against cancer cells: the role of microRNA-93 / M. Ashrafizadeh, M. Najafi, R. Mohammadinejad [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2020. – V. 20. – P. 277. DOI: 10.1186/s12935-020-01349-x.

121. Fragoso, R. Kinases, tails and more: regulation of PTEN function by

phosphorylation / R. Fragoso, J. T. Barata // *Methods*. – 2015. – V. 77 (78). – P. 75–81. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.10.015.

122. Frequency and types of EGFR mutations in Moroccan patients with non-small cell lung cancer / M. L. Sow, H. E. Yacoubi, B. Moukafih [et al.] // *Tumori Journal*. – 2021. – V. 107 (4). – P. 335–340. DOI: 10.1177/0300891620964571.

123. Fruman, D. A. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities / D. A. Fruman, C. Rommel // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2014. – V. 13 (2). – P. 140–156. DOI: 10.1038/nrd4204.

124. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR / M. Maemondo, A. Inoue, K. Kobayashi [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – V. 362 (25). – P. 2380–2388. DOI: 10.1056/NEJMoa0909530.

125. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial / T. Mitsudomi, S. Morita, Y. Yatabe [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2010. – V. 11 (2). – P. 121–128. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.

126. Genetic association study of CYP1A1 polymorphisms identifies risk haplotypes in nonsmall cell lung cancer / C. M. Wright, J. E. Larsen, M. L. Colosimo [et al.] // *Eur Respir J.* – 2010. – V. 35 (1). – P. 152–159. DOI: 10.1183/09031936.00120808.

127. Genetic determinants of CYP2A6 activity across racial/ethnic groups with different risks of lung cancer and effect on their smoking intensity / S. L. Park, M. I. Tiirikainen, Y. M. Patel [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2016. – V. 37. – P. 269–279. DOI: 10.1093/carcin/bgw012.

128. Genetic Risk Can Be Decreased: Quitting Smoking Decreases and Delays Lung Cancer for Smokers With High and Low CHRNA5 Risk Genotypes – A Meta-Analysis / L. S. Chen, T. Baker, R. J. Hung [et al.] // *EBioMedicine*. – 2016. – V. 11. – P. 219–226. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.012.

129. Genome-wide mapping and analysis of aryl hydrocarbon receptor (AHR)- and aryl hydrocarbon receptor repressor (AHRR)-binding sites in human breast cancer

cells / S. Y. Yang, S. Ahmed, S. V. Satheesh [et al.] // Arch Toxicol. – 2018. – V. 92 (1). – P. 225–240. DOI: 10.1007/s00204-017-2022-x.

130. Genomic variations in the counterpart normal controls of lung squamous cell carcinomas / L. Qu, B. Zhou, G. Wang [et al.] // Front. Med. – 2018. – V. 12 (3). – P. 280–288. DOI: 10.1007/s11684-017-0580-1.

131. Gibelin, C. Somatic alterations in lung cancer: do environmental factors matter? / C. Gibelin, S. Couraud // Lung Cancer. – 2016. – V. 100. – P. 45–52. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.07.015.

132. Girard, N. Optimizing outcomes and treatment sequences in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: recent updates / N. Girard // Future Oncol. – 2019. – V. 15 (25). – P. 2983–2997. DOI: 10.2217/fon-2019-0400.

133. Girard, N. Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC: which tyrosine kinase inhibitor and when? / N. Girard // Future Oncol. – 2018. – V. 14 (11). – P. 1117–1132. DOI: 10.2217/fon-2017-0636.

134. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2021. – V. 71 (3). – P. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.

135. GLOBOCAN : [website]. – URL: <https://gco.iarc.fr> (date of the application: 24.12.2022) – Text : electronic.

136. Gourd, E. Overall survival with osimertinib in untreated NSCLC / E. Gourd // Lancet Oncol. – 2020. – V. 21 (1). – P. 15. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30778-8.

137. Grishanova, A. Y. Aryl Hydrocarbon Receptor in Oxidative Stress as a Double Agent and Its Biological and Therapeutic Significance / A. Y. Grishanova, M. L. Perepechaeva // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23 (12). – P. 6719. DOI: 10.3390/ijms23126719.

138. Gut microbiota-derived tryptophan metabolism mediates renal fibrosis by aryl hydrocarbon receptor signaling activation / J.R. Liu, H. Miao, D.Q. Deng [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2021. – V. 78. – P. 909–922. DOI: 10.1007/s00018-020-03645-1.

139. Gutierrez-Vazquez, C. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor / C. Gutierrez-Vazquez, F. J. Quintana // *Immunity*. – 2018. – V. 48. – P. 19–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.12.012.
140. Hall, F. S. Genetic Risk for Lung Cancer and the Benefits of Quitting Smoking / F. S. Hall // *EBioMedicine*. – 2016. – V. 11. – P. 19–20. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.08.026.
141. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – V. 144 (5). – P. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
142. Harrison, P. T. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer / P. T. Harrison, S. Vyse, P. H. Huang // *Semin Cancer Biol.* – 2020. – V. 61. – P. 167–179. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.09.015.
143. Heavy smoking and lung cancer: Are women at higher risk? Result of the ICARE study / A. Papadopoulos, F. Guida, K. Leffondré [et al.] // *Br J Cancer*. – 2014. – V. 110 (5). – P. 1385–1391. DOI: 10.1038/bjc.2013.821.
144. Hecht, S. S. Lung carcinogenesis by tobacco smoke / S. S. Hecht // *Int J Cancer*. – 2012. – V. 131 (12). – P. 2724–2732. DOI: 10.1002/ijc.27816.
145. Helena, C. Afatinib in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Rare EGFR (in exon 18-T179X) Mutation - a Case Report / C. Helena, V. Rostislav // *Clin. Onkol.* – 2018. – Vol. 31 (5). – P. 380–383. DOI: 10.14735/amko2018380.
146. Heparan Sulfate Proteoglycans Promote Telomerase Internalization and MHC Class II Presentation on Dendritic Cells / J. Galaine, G. Kellermann, Y. Guillaume [et al.] // *J Immunol.* – 2016. – V. 197 (5). – P. 1597–608. DOI: 10.4049/jimmunol.1502633.
147. Heterogeneous responses to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with uncommon EGFR mutations: new insights and future perspectives in this complex clinical scenario / A. Russo, T. Franchina, G. Ricciardi [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20 (6). – P. 1431. DOI: 10.3390/ijms20061431.

148. Higgs, G. The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis / G. Higgs, F. Slack // *J Clin Bioinforma.* – 2013. – V. 3 (1). – P. 17. DOI: 10.1186/2043-9113-3-17.

149. High copy number variation of cancer-related microRNA genes and frequent amplification of DICER1 and DROSHA in lung cancer / K. Czubak, M. A. Lewandowska, K. Klonowska [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6. – P. 23399–23416. DOI: 10.18632/oncotarget.4351.

150. ICRP Publication 115. Lung cancer risk from radon and progeny and statement on radon / M. Tirmarche, J. D. Harrison, D. Laurier [et al.] // *Ann ICRP.* – 2010. – V. 40 (1). – P. 1–64. DOI: 10.1016/j.icrp.2011.08.011.

151. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers / P. A. Steck, M. A. Pershouse, S. A. Jasser [et al.] // *Nat Genet.* – 1997. – V. 15 (4). – P. 356–62. DOI: 10.1038/ng0497-356.

152. Identification of a subset of human non-small cell lung cancer patients with high PI3Kbeta and low PTEN expression, more prevalent in squamous cell carcinoma / M. Cumberbatch, X. Tang, G. Beran [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – V. 20. – P. 595–603. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1638.

153. Identifying and Characterizing Stress Pathways of Concern for Consumer Safety in Next-Generation Risk Assessment / S. Hatherell, M. T. Baltazar, J. Reynolds [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2020. – V. 176. – P. 11–33. DOI: 10.1093/toxsci/kfaa054.

154. Ilyas, S. Landscape of tumor antigens in T cell immunotherapy / S. Ilyas, J. C. Yang // *J Immunol.* – 2015. – V. 195 (11). – P. 5117–5122. DOI: 10.4049/jimmunol.1501657

155. Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2 cm or smaller / J.-I. Nitadori, A. J. Bograd, K. Kadota [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* – 2013. – Vol. 105 (6). – P. 1212–1220. DOI: 10.1093/jnci/djt166.

156. Impact of smoking status on the relative efficacy of the EGFR TKI/angiogenesis inhibitor combination therapy in advanced NSCLC—a systematic review and meta-analysis / U. Dafni, R. A. Soo, S. S. Peters [et al.] // *ESMO Open.* –

2022. – V. 7 (3). – P. 100507. DOI: 10.1016/j.esmoop.2022.100507.

157. In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer / T. Hirano, H. Yasuda, T. Tani [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6 (36). – P. 38789–38803. DOI: 10.18632/oncotarget.5887.

158. In-depth PtdIns(3,4,5)P3 signalosome analysis identifies DAPP1 as a negative regulator of GPVI-driven platelet function / T. N. Durrant, J. L. Hutchinson, K. J. Heesom [et al.] // *Blood Adv.* – 2017. – V. 1 (14). – P. 918–932. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017005173.

159. Indole-3-carbinol induces G1 cell cycle arrest and apoptosis through aryl hydrocarbon receptor in THP-1 monocytic cell line / S. Mohammadi, F. S. Seyedhosseini, N. Behnampour, Y. Yazdani // *Recept. Signal. Transduct. Res.* – 2017. – V. 37. – P. 506–514. DOI: 10.1080/10799893.2017.1360351.

160. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment / S. Saab, H. Zalzale, Z. Rahal [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – V. 11. – P. 159. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00159.

161. Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients / Z. Yang, N. Yang, Q. Ou [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2018. – V. 24 (13). – P. 3097–3107. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2310.

162. Kelderman, S. Tumor antigens in human cancer control. *Biochim Biophys Acta* / S. Kelderman, P. Kvistborg – 2016. – V. 1865 (1). – P. 83–89. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.10.004.

163. Kligerman, S. Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening / S. Kligerman, C. White // *AJR Am J Roentgenol.* – 2011. – V. 196. – P. 287–295. DOI: 10.2214/AJR.10.5412.

164. Knockdown of the sodium-dependent phosphate co-transporter 2b (NPT2b) suppresses lung tumorigenesis / S. Hong, A. Minai-Tehrani, S. Chang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – V. 8 (10). – P. 77121. DOI: 10.1371/journal.pone.0077121.

165. Kobayashi, Y. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung

cancer are created equal: perspectives for individualized treatment strategy / Y. Kobayashi, T. Mitsudomi // *Cancer Sci.* – 2016. – V. 107 (9). – P. 1179–1186. DOI: 10.1111/cas.12996

166. Lamorte, S. Nuclear receptors, the aryl hydrocarbon receptor, and macrophage function / S. Lamorte, R. Shinde, T. L. McGaha // *Mol. Asp. Med.* – 2021. – V. 78/ – P. 100942. DOI: 10.1016/j.mam.2021.100942.

167. Lee, Y. R. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects / Y. R. Lee, M. Chen, P. P. Pandolfi // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2018. – V. 19 (9). – P. 547–562. DOI: 10.1038/s41580-018-0015-0.

168. Lee, Y. S. How do K-RAS-activated cells evade cellular defense mechanisms? / Y. S. Lee, S. C. Bae // *Oncogene.* – 2016. – V. 35. – P. 827–832. DOI: 10.1038/onc.2015.153.

169. Li, C. MiR-93 Promotes Tumorigenesis and Metastasis of Non Small Cell Lung Cancer Cells by Activating the PI3K/Akt Pathway via Inhibition of LKB1/PTEN/CDKN1A / C. Li, J. Lyu, Q. H. Meng // *Journal of Cancer.* – 2017. – V. 8 (5). – P. 870–879. DOI: 10.7150/jca.17958.

170. Liao, B.-C. Second and third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer / B.-C. Liao, C.-C. Lin, J. C.-H. Yang // *Curr Opin Oncol.* – 2015. – V. 27 (2). – P. 94–101. DOI: 10.1097/CCO.000000000000164.

171. Lipid Accumulation in Peripheral Blood Dendritic Cells and Anticancer Immunity in Patients with Lung Cancer / R. Arai, S. Soda, T. Okutomi [et al.] // *J Immunol Res.* – 2018 – V. 2018. – P. 5708239. DOI: 10.1155/2018/5708239.

172. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC / C. Rolfo, P. C. Mack, G. V. Scagliotti [et al.] // *J Thorac Oncol.* – 2018. – V. 13 (9). – P. 248–268. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.05.030.

173. Liquid biopsy genotyping in lung cancer: ready for clinical utility? / W. L. Huang, Y. L. Chen, S. C. Yang [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8 (11). – P. 18590–18608.

174. Liu, J. MiR-181 regulates cisplatin-resistant non-small cell lung cancer via

downregulation of autophagy through the PTEN/PI3K/AKT pathway / J. Liu, Y. Xing, L. Rong // *Oncology Reports*. –2018. – V. 39 (4). – P. 1631–1639. DOI: 10.3892/or.2018.6268.

175. Lo, R. High-resolution genome-wide Mapping of AHR and ARNT binding sites by ChIP-Seq / R. Lo, J. Matthews // *Toxicol. Sci.* – 2012. – V. 130 (2). – P. 349–361. DOI: 10.1093/toxsci/kfs253.

176. Loss of phosphatase and tensin homolog protein expression is an independent poor prognostic marker in lung adenocarcinoma / N. Yanagawa, C. Leduc, D. J. Kohler [et al.] // *Thorac. Oncol.* – 2012. – V. 7 (10). – P. 1513–1521. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182641d4f.

177. Loss of PTEN Expression is an Independent Poor Prognostic Factor in Non-small Cell Lung Cancer / S. B. Yoo, X. Xu, H. J. Lee [et al.] // *J. Pathol. Transl. Med.* – 2011. – V. 45. – P. 329–335.

178. Lung Cancer and Hormone Replacement Therapy: Association in the Vitamins and Lifestyle Study / C. G. Slatore, J. W. Chien, D. H. Au [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2010. – V. 28 (9). – P. 1540–1546. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.9739.

179. Lung cancer and occupation in a population-based case-control study / D. Consonni, S. De Matteis, J. H. Lubin [et al.] // *Am J Epidemiol.* – 2010. – V. 171 (3). – P. 323–333. DOI: 10.1093/aje/kwp391.

180. Lung cancer and smoking trends in the young in Switzerland: a study based on data of the National Institute for Cancer Epidemiology and Registration and of the Swiss Health Surveys / S. M. Mousavi, S. Schmid, T. Germy, M. Früh // *Swiss Med. Wkly.* – 2018. – V. 148. – P. 14708. DOI: 10.4414/smw.2018.14708.

181. Lung cancer in never smokers – a review / S. Couraud, G. Zalcman, B. Milleron [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2012. – V. 48 (9). – P. 1299–1311. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.03.007.

182. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking / L. Corrales, R. Rosell, A. F. Cardona [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2020. – V. 148. – P. 102895. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102895.

183. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis

and comparison of never and ever smokers / A. M. Chapman, K. Y. Sun, P. Ruestow [et al.] // *Lung Cancer*. – 2016. – V. 102. – P. 122–134. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.10.010.

184. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity / C. Brambilla, J. Laffaire, S. Lantuejoul [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2014. – Vol. 20. – P. 5777–5786. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0459.

185. Lung Master Protocol (Lung-MAP)-A Biomarker-Driven Protocol for Accelerating Development of Therapies for Squamous Cell Lung Cancer: SWOG S1400 / R. S. Herbst, D. R. Gandara, F. R. Hirsch [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 2015. – Vol. 21 (7). – P. 1514–1524. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3473.

186. Luo, S. The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis / S. Luo, J. Chen, X. Mo // *Onco Targets Ther*. – 2016. – V. 9. – P. 5643–50. DOI: 10.2147/OTT.S111684.

187. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both / N. Katakami, S. Atagi, K. Goto [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2013. – V. 31 (27). – P. 3335–3341. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.0981.

188. Managing Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer: Treatment and Novel Strategies / A. Passaro, J. Brahmer, S. Antonia [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2022. – V. 40 (6). – P. 598–610. DOI: 10.1200/JCO.21.01845.

189. Manning, B. D. AKT/PKB signaling: navigating downstream / B. D. Manning, L. C. Cantley // *Cell*. – 2007. – V. 129 (7) – P. 1261–1274. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.

190. Mashima, R. Physiological roles of miR-155 / R. Mashima // *Immunology*. – 2015. – V. 145 (3). – P. 323–333. DOI: 10.1111/imm.12468.

191. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer / J. H. Cha, L. C. Chan, C. W. Li [et al.] // *Mol Cell*. – 2019. – V. 76 (3). – P. 359–370. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.030.

192. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity / V. Álvarez-García, Y. Tawil, H. M. Wise, N. R. Leslie // *Semin Cancer Biol*. – 2019. – V. 59. –

P. 66–79. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.02.001.

193. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells / S. Chen, G. A. Crabill, T. S. Pritchard [et al.] // *J Immunother Cancer*. – 2019. – V. 7 (1). – P. 305. DOI: 10.1186/s40425-019-0770-2.

194. Meenakshi, C. Synergistic effect of radon in blood cells of smokers - an in vitro study / C. Meenakshi, M. N. Mohankumar // *Mutat Res*. – 2013. – V. 757 (1). – P. 79–82. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.018.

195. Meta-Analysis and Systematic Review in Environmental Tobacco Smoke Risk of Female Lung Cancer by Research Type / X. Ni, N. Xu, Q. Wang // *Int J Environ Res Public Health*. – 2018. – V. 15 (7). – P. 1348. DOI: 10.3390/ijerph15071348.

196. Meta-analysis of the CYP1A2 -163C>A polymorphism and lung cancer risk / S. Q. Deng, X. T. Zeng, Y. Wang [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2013. – V. 14 (5). – P. 3155-8. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.5.3155.

197. Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: clinical predictors of histopathology and outcome / M. J. Cha, H. Y. Lee, K. S. Lee [et al.] // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2014. – Vol. 147. – P. 921–928. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.09.045.

198. MicroRNA evolution by arm switching / S. Griffiths-Jones, J. H. L. Hui, A. Marco, M. Ronshaugen // *EMBO Rep*. – 2011. – V. 12 (2). – P. 172–177. DOI: 10.1038/embor.2010.191.

199. MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance / M. A. Iqbal, S. Arora, G. Prakasam [et al.] // *Mol Aspects Med*. – 2019. – V. 70. – P. 3–20. DOI: 10.1016/j.mam.2018.07.003.

200. MicroRNA let-7: Regulation, single nucleotide polymorphism, and therapy in lung cancer / G. Yang, W. Zhang, C. Yu [et al.] // *J Cancer Res Ther*. – 2015. – V. 11. – P. 1–6. DOI: 10.4103/0973-1482.163830.

201. microRNA therapeutics in cancer – an emerging concept / M. Y. Shah, A. Ferrajoli, A. K. Sood [et al.] // *E Bio Medicine*. – 2016. – V. 12. – P. 34–42. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.017.

202. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN / Z.-L. Liu, H. Wang, J. Liu, Z.-X. Wang // *Mol Cell Biochem.* – 2013. – V. 372 (1-2). – P. 35-45. DOI: 10.1007/s11010-012-1443-3.

203. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) / J. G. Zhang, J. J. Wang, F. Zhao [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2010. – V. 411 (11-12). – P. 846–852. DOI: 10.1016/j.cca.2010.02.074.

204. MicroRNA-4286 promotes cell proliferation, migration, and invasion via PTEN regulation of the PI3K/Akt pathway in non-small cell lung cancer / C. Ling, X. Wang, J. Zhu [et al.] // *Cancer Med.* – 2019. – V. 8 (7). – P. 3520–3531. DOI: 10.1002/cam4.2220.

205. MicroRNA-92a promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer metastasis / C. Lu, Z. Shan, J. Hong, L. Yang // *Int J Oncol.* – 2017. – V. 51 (1). – P. 235–244. DOI: 10.3892/ijo.2017.3999.

206. MicroRNAs: A novel potential biomarker for diagnosis and therapy in patients with non-small cell lung cancer / Q. Zhou, Sh.-X. Huang, F. Zhang [et al.] // *Cell Prolif.* – 2017. – V. 50 (6). – P. 12394. DOI: 10.1111/cpr.12394.

207. Mierke, C. T. The Pertinent Role of Cell and Matrix Mechanics in Cell Adhesion and Migration / C. T. Mierke // *Front Cell Dev Biol.* –2021. – V. 9. – P. 720494. DOI: 10.3389/fcell.2021.720494.

208. miR-106a promotes growth and metastasis of non-small cell lung cancer by targeting PTEN / X. Xie, H. T. Liu, J. Mei [et al.] // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – V. 8 (4). – P. 3827–3834.

209. MiR-130 exerts tumor suppressive function on the tumorigenesis of human non-small cell lung cancer by targeting PTEN / L. Ye, Y. Wang, L. Nie [et al.] // *Am J Transl Res.* – 2017. – V. 9 (4). –P. 1856–1865.

210. miR-130a Regulates Macrophage Polarization and Is Associated With Non-Small Cell Lung Cancer / L. Lin, H. Lin, L. Wang [et al.] // *Oncol Rep.* – 2015. –

V. 34 (6). – P. 3088–3096. DOI: 10.3892/or.2015.4301.

211. miR-146a controls immune response in the melanoma microenvironment / J. Mastroianni, N. Stickel, H. Andrlova [et al.] // *Cancer Res.* – 2019. – V. 79 (1). – P. 183. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1397.

212. MIR155HG is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration and immune checkpoint molecules expression in multiple cancers / L. Peng, Z. Chen, Y. Chen [et al.]. // *Cancer Med.* – 2019. – V. 8 (17). – P. 7161–7173. DOI: 10.1002/cam4.2583.

213. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN / X. Xue, Y. Liu, Y. Wang [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – P. 8450. DOI: 10.18632/oncotarget.13022.

214. miR-21 Depletion in Macrophages Promotes Tumoricidal Polarization and Enhances PD-1 Immunotherapy / J. Xi, Q. Huang, L. Wang [et al.] // *Oncogene.* – 2018. – V. 37 (23). – P. 3151–3165. DOI: 10.1038/s41388-018-0178-3.

215. MiR-21 inhibitor suppressed the progression of retinoblastoma via the modulation of PTEN/PI3 K/AKT pathway / F. Gui, Z. Hong, Z. You [et al.] // *Cell Biol Int.* – 2016. – V. 40 (12). – P. 1294–1302. DOI: 10.1002/cbin.10678.

216. MiR-301a transcriptionally activated by HIF-2 α promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting TP63 in pancreatic cancer / K. D. Zhang, B. Hu, G. Cen [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2020. – V. 26 (19). – P. 2349–2373. DOI: 10.3748/wjg.v26.i19.2349.

217. miR-301a-PTEN-AKT Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Promotes Cardiac Repair Post-MI / L. Zhen, Q. Zhao, J. Lü [et al.] // *Mol Ther Nucleic Acids.* – 2020. – V. 22. – P. 251–262. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.08.033.

218. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer / E. Gallardo, A. Navarro, N. Vinolas [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2009. – V. 30. – P. 1903–1909. DOI: 10.1093/carcin/bgp219.

219. miRNAs and lncRNAs as Novel Therapeutic Targets to Improve Cancer Immunotherapy / M. Di Martino, C. Riillo, F. Scionti [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2021. – V. 13 (7). – P. 1587. DOI: 10.3390/cancers13071587.

220. miRNAs in lung cancer. A systematic review identifies predictive and prognostic miRNA candidates for precision medicine in lung cancer / S. Zhong, H. Golpon, P. Zardo, J. Borlak // *Transl Res.* – 2021. – V. 230. – P. 164-196. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.11.012.

221. Mitochondrial Dysfunction as a Hallmark of Environmental Injury / C. Duarte-Hospital, A. Tete, F. Brial [et al.] // *Cells.* – 2021. – V. 11 (1). – P. 110. DOI: 10.3390/cells11010110.

222. Molecular and epigenetic mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis / Q. Y. Chen, A. Murphy, H. Sun, M. Costa // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2019. – Vol. 15. – P. 377. DOI: 10.1016/j.taap.2019.114636.

223. Molecular mechanisms of pulmonary carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Implications for human lung cancer / R. Stading, G. Gastelum, C. Chu [et al.] // *Semin Cancer Biol.* – 2021. – V. 76. – P. 3–16. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.07.001.

224. Molecular Screening of Small Biopsy Samples Using Next-Generation Sequencing in Korean Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-13-01) / B. M. Ku, M. H. Heo, J. H. Kim [et al.] // *J. Pathol. Transl. Med.* – 2018. – V. 52. – P. 148–156. DOI: 10.4132/jptm.2018.03.12.

225. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update / G. P. Kalemkerian, N. Narula, E. B. Kennedy [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2018. – V. 36 (9). – P. 911–919. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.7293.

226. Molecularly targeted therapies in nonsmall-cell lung cancer annual update 2014 / D. Morgensztern, M. J. Campo, S. E. Dahlberg [et al.] // *J Thorac Oncol.* – 2015. – V. 10 (1). – P. 1–63. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000405.

227. Mongroo, P. S. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition / P. S. Mongroo, A. K. Rustg // *Cancer Biol Ther.* – 2010. – V. 10 (3). –

P. 219–222. DOI: 10.4161/cbt.10.3.12548.

228. Mulero-Navarro, S. New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology / S. Mulero-Navarro, P. M. Fernandez-Salguero // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2016. – V. 4. – P. 45. DOI: 10.3389/fcell.2016.00045.

229. Munagala, R. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer / R. Munagala, F. Aqil, R. C. Gupta // *Tumour Biol.* – 2016. – V. 37 (8). – P. 10703–10714. DOI: 10.1007/s13277-016-4939-8.

230. Murray, I. A. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe / I. A. Murray, A. D. Patterson, G. H. Perdew // *Nat Rev Cancer.* – 2014. – V. 14 (12). – P. 801–814. DOI: 10.1038/nrc3846.

231. Nanopharmacology in translational hematology and oncology / C. Tomuleasa, C. Braicu, A. Irimie [et al.] // *Int J Nanomed.* – 2014. – V. 9. – P. 3465–3479. DOI: 10.2147/IJN.S60488.

232. Naseri-Nosar, P. The aryl hydrocarbon receptor facilitates the human cytomegalovirus-mediated G1/S block to cell cycle progression / P. Naseri-Nosar, M. T. Nogalski, T. Shenk, T. Shenk // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2021. – V. 118 (12). – P. 2026336118. DOI: 10.1073/pnas.2026336118.

233. Natural killer cells in the human lung tumor microenvironment display immune inhibitory functions / J. Russick, P. E. Joubert, M. Gillard-Bocquet [et al.] // *J Immunother Cancer.* – 2020. – V. 8 (2). – P. 001054. DOI: 10.1136/jitc-2020-001054.

234. Nebert, D. W. Aryl hydrocarbon receptor (AHR): «pioneer member» of the basic-helix/loop/helix-per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of «sensors» of foreign and endogenous signals / D. W. Nebert // *Prog. Lipid Res.* – 2017. – V. 67. – P. 38–57. DOI: 10.1016/j.plipres.2017.06.001.

235. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN / X. Wang, L. C. Trotman, T. Koppie [et al.] // *Cell.* – 2007. – V. 128 (1). – P. 129–39. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.039.

236. Next-Generation Sequencing Approach to Non-Small Cell Lung Carcinoma Yields More Actionable Alterations / M. Mehrad, S. Roy, H. T. Bittar, S. Dacic // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2018. – V. 142. – P. 353–357. DOI:

10.5858/arpa.2017-0046-OA.

237. Nicotinic-nAChR signaling mediates drug resistance in lung cancer / W. L. Cheng, K. Y. Chen, K. Y. Lee [et al.] // *J Cancer*. – 2020. – V. 11 (5). – P. 1125–1140. DOI: 10.7150/jca.36359.

238. Non-small cell lung cancer associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, validation and clinical significance / C. Li, Y. Yin, X. Liu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8 (15). – P. 24564–24578. DOI: 10.18632/oncotarget.15596.

239. Noone, A. M. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2015 / A. M. Noone, M. Krapcho, D. Miller // Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2018.

240. North, C. M. Women and lung cancer: what is new? / C. M. North, D. C. Christiani // *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. – 2013. – V. 25 (2). – P. 87-94. DOI: 10.1053/j.semtcvs.2013.05.002.

241. Novel association of genetic markers affecting CYP2A6 activity and lung cancer risk / Y. M. Patel, S. L. Park, Y. Han [et al.] // *Cancer Res*. – 2016. – V. 76 – P. 5768–5776. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0446.

242. Oncolytic viruses and immune checkpoint inhibition: the best of both worlds / V. Sivanandam, C. J. LaRocca, N. G. Chen [et al.] // *Mol Ther Oncol*. – 2019. – V. 13. – P. 93–106. DOI: 10.1016/j.omto.2019.04.003.

243. Origin and development of classical dendritic cells / P. Guermonprez, Y. Gerber-Ferder, K. Vaivode [et al.] // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2019. – V. 349. – P. 1–54. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.08.002.

244. Osada, H. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development / H. Osada, T. Takahashi // *Cancer Sci*. – 2011. – V. 102 (1). – P. 9–17. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01707.x.

245. Osimertinib in patients with T790M mutation-positive, advanced non-small cell lung cancer: Long-term follow-up from a pooled analysis of 2 phase 2 studies / M-J. Ahn, C-M. Tsai, F. A. Shepherd [et al.] // *Cancer*. – 2019. – V. 125 (6). – P. 892–901. DOI: 10.1002/cncr.31891.

246. Osimertinib in Pretreated T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell

Lung Cancer: AURA Study Phase II Extension Component / J. C.-H. Yang, M.-J. Ahn, D.-W. Kim [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2017. – V. 35 (12). – P. 1288–1296. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.3223.

247. Osimertinib in Untreated EGFR Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer / J. C. Soria, Y. Ohe, J. Vansteenkiste [et al.] // *N Engl J Med.* – 2018. – V. 378 (2). – P. 113–125. DOI: 10.1056/NEJMoa1713137.

248. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer / T. S. Mok, Y.-L. Wu, M.-J. Ahn [et al.] // *N Engl J Med.* – 2017. – V. 376 (7). – P. 629–640. DOI: 10.1056/NEJMoa1612674.

249. Osimertinib versus platinum-pemetrexed for patients with EGFR T790M advanced NSCLC and progression on a prior EGFR-tyrosine kinase inhibitor: AURA3 overall survival analysis / V. A. Papadimitrakopoulou, T. S. Mok, J.-Y. Han [et al.] // *Ann Oncol.* – 2020. – V. 31 (11). – P. 1536–1544. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2100.

250. Osimertinib versus standard-of-care EGFR-TKI as first-line treatment for EGFRm advanced NSCLC: FLAURA Japanese subset / Y. Ohe, F. Imamura, N. Nogami [et al.] // *Jpn J Clin Oncol.* – 2019. – V. 49 (1). – P. 29–36. DOI: 10.1093/jjco/hyy179.

251. Outcomes of First-Generation EGFR-TKIs Against Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Post Hoc Analysis of the BE-POSITIVE Study / S. Pilotto, A. Rossi, T. Vavalà [et al.] // *Clin. Lung Cancer.* – 2018. – V. 19 (1). – P. 93–104. DOI: 10.1016/j.clcc.2017.05.016

252. Ovchinnikov, V. Y. The search of CAR, AhR, ESRs binding sites in promoters of intronic and intergenic microRNAs / V. Y. Ovchinnikov, D. V. Antonets, L. F. Gulyaeva // *J Bioinform Comput Biol.* – 2018. – V.16 (1). – P. 1750029. DOI: 10.1142/S0219720017500299.

253. Overall survival analyses of first-line erlotinib versus chemotherapy in the EURTAC study population controlling for the use of post-study therapy / L. F. Leon, A. Golsorkhi, S. Liu [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2014. – V. 25. – P. 426- 470. DOI: 10.1093/annonc/mdu349.52.

254. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC / S. S. Ramalingam, J. Vansteenkiste, D. Planchard [et al.] // *N Engl J Med.* – 2020. – V. 382 (1). – P. 41–50. DOI: 10.1056/NEJMoa1913662.

255. Overview of current systemic management of EGFR-mutant NSCLC / W. H. Hsu, J. C-H. Yang, T. S. Mok, H. H. Loong // *Ann Oncol.* – 2018. – V. 29 (1). – P. 3–9. DOI: 10.1093/annonc/mdx702.

256. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC / C. Bica-Pop, R. Cojocneanu-Petric, L. Magdo [et al.] // *Cell Mol Life Sci.* – 2018. – V. 75. – P. 3539–3551. DOI: 10.1007/s00018-018-2877-x.

257. p23 protects the human aryl hydrocarbon receptor from degradation via a heat shock protein 90-independent mechanism / B. Pappas, Y. Yang, Y. Wang [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2018. – V. 152. – P. 34–44. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.03.015.

258. Particulate matter induces inflammatory cytokine production via activation of NF kappa B by TLR5-NOX4-ROS signaling in human skin keratinocyte and mouse skin / Y. S. Ryu, K. A. Kang, M. J. Piao [et al.] // *Redox Biol.* – 2019. – V. 21. – P. 101080. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101080.

259. Patriarca, S. TNM classification of malignant tumours. Eighth edition / S. Patriarca, S. Ferretti, R. Zanetti // *Epidemiol Prev.* – 2017. – V. 41 (2). – P. 140–143. DOI: 10.19191/EP17.2.P140.034.

260. PCAF modulates PTEN activity / K. Okumura, M. Mendoza, R. M. Bachoo [et al.] // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281 (36). – P. 26562-8. DOI: 10.1074/jbc.M605391200.

261. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome / H. O. Alsaab, S. Sau, R. Alzhrani [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2017. – V. 8. – P. 561. DOI: 10.3389/fphar.2017.00561.

262. PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: updated survival data / P. N. Aguiar Jr., R. A. De Mello, P. Hall [et al.] // *Immunotherapy.* – 2017. – V. 9 (6). – P. 499–506. DOI: 10.2217/imt-2016-0150.

263. Personalized neoantigen pulsed dendritic cell vaccine for advanced lung

cancer / Z. Ding, Q. Li, R. Zhang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – V. 6 (1). – P. 26. DOI: 10.1038/s41392-020-00448-5.

264. Phase II study of docetaxel in combination with everolimus for second- or third-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer / S. S. Ramalingam, T. K. Owonikoko, M. J. Behera [et al.] // *Thorac. Oncol.* – 2013. – V. 8 (3). – P. 369–372. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318282709c.

265. Phase II study of everolimus-erlotinib in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer / B. Besse, N. Leigh, J. Bannouna [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2014. – V. 25. – P. 409–415. DOI: 10.1093/annonc/mdt536.

266. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations / L. V. Sequist, J. C. Yang, N. Yamamoto [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2013. – V. 31 (27). – P. 3327–3334. DOI: 10.1200/JCO.2012.02547.

267. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-induced Pulmonary Carcinogenesis in Cytochrome P450 (CYP)1A1- and 1A2-Null Mice: Roles of CYP1A1 and CYP1A2 / G. Gastelum, W. Jiang, L. Wang, G. [et al.] // *Toxicol Sci.* – 2020. – V. 177 (2). – P. 347–361. DOI: 10.1093/toxsci/kfaa107.

268. Polymorphism in cytochrome P450 1A2 and their interaction with risk factors in determining risk of squamous cell lung carcinoma in men / A. P. Singh, M. C. Pant, M. Ruwali [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2010. – V. 8 (6). – P. 351–359. DOI: 10.3233/CBM-2011-0224.

269. PTEN Alterations and Their Role in Cancer Management: Are We Making Headway on Precision Medicine? / N. Fusco, E. Sajjadi, K. Venetis [et al.] // *Genes.* – 2020. – V. 11. – P. 719. DOI: 10.3390/genes11070719.

270. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis of the literature / J. Xiao, C. P. Hu, B. X. He [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – P. 57832–57840. DOI: 10.18632/oncotarget.11068.

271. PTEN in Lung Cancer: Dealing with the Problem, Building on New Knowledge and Turning the Game Around / A. Gkountakos, G. Sartori, I. Falcone [et

al.] // *Cancers (Basel)*. – 2019. – V. 11 (8). – P. 1141. DOI: 10.3390/cancers11081141

272. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers / G. Jin, M. J. Kim, H. S. Jeon [et al.] // *Lung Cancer*. – 2010. – V. 69 (3). – P. 279–83. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.11.012.

273. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy / N. Haddadi, Y. Lin, G. Travis [et al.] // *Mol Cancer*. – 2018. – V. 17 (1). – P. 37. DOI: 10.1186/s12943-018-0803-3.

274. Radon and COPD mortality in the American Cancer Society Cohort / M. C. Turner, D. Krewski, Y. Chen [et al.] // *Eur Respir J*. – 2012. – V. 39 (5). – P. 1113–1119. DOI: 10.1183/09031936.00058211.

275. Real-world data on treatment outcomes in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer patients receiving osimertinib in second or further lines / A. Maso, M. Lorenzi, A. Ferro [et al.] // *Future Oncol*. – 2021. – V. 17 (19). – P. 2513–2527. DOI: 10.2217/fon-2021-0356.

276. Recent Progress of Small-Molecule Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitors against C797S Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer / L. Chen, W. Fu, L. Zheng [et al.] // *J Med Chem*. – 2018. – Vol. 61 (10). – P. 4290–4300. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01310.

277. Reduced Lung–Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial / H. J. de Koning, C. M. van der Aalst, P. A. de Jong [et al.] // *N Engl J Med*. – 2020. – V. 382 (6). – P. 503–513. DOI: 10.1056/NEJMoa1911793.

278. Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis / K. Kadota, J. Nitadori, N. Rekhtman [et al.] // *Am J Surg Pathol*. – 2015. – Vol. 39 (9). – P. 1170–1180. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000439.

279. Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review) / X. Wang, L. Cao, Y. Wang [et al.] // *Oncol Lett*. – 2012. – V. 3 (5). – P. 955–960. DOI: 10.3892/ol.2012.609.

280. Regulation of PTEN degradation and NEDD4-1 E3 ligase activity by Numb / C. Shao, Z. Li, N. Ahmad, X. Liu // *Cell Cycle*. – 2017. – V. 16 (10). – P. 957–

967. DOI: 10.1080/15384101.2017.1310351.

281. Regulation of PTEN transcription by p53 / V. Stambolic, D. MacPherson, D. Sas [et al.] // *Mol Cell*. – 2001. – V. 8 (2). – P. 317–325. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00323-9.

282. Residential Radon Exposure and Cigarette Smoking in Association with Lung Cancer: A Matched Case-Control Study in Korea / E. J. Park, H. Lee, H. C. Kim [et al.] // *Int J Environ Res Public Health*. – 2020. – Vol. 17 (8). – P. 1–9. DOI: 10.3390/ijerph17082946.

283. Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators / M. Geretto, A. Pulliero, C. Rosano [et al.] // *Am J Cancer Res*. – 2017. – V. 7 (6). – P. 1350–1371. PMID: PMC5489783.

284. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer / T. R. Church, W. C. Black, D. R. Aberle [et al.] // *N Engl J Med*. – 2013. – V. 368 (21). – P. 1980–91. DOI: 10.1056/NEJMoa1209120.

285. Role of DNA methylation regulation of miR-130b expression in human lung cancer using bioinformatics analysis / J. Wang, X. F. Yu, N. Yang [et al.] // *Toxicol Environ Health A*. – 2019. – V. 16. – P. 1–9. DOI: 10.1080/15287394.2019.1667634.

286. Role of miRNA in Lung Cancer-Potential Biomarkers and Therapies / X. Du, J. Zhang, J. Wang [et al.] // *Curr Pharm Des*. – 2018. – V. 23 (39). – P. 5997–6010. DOI: 10.2174/1381612823666170714150118.

287. Rothhammer, V. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease / V. Rothhammer, F. J. Quintana // *Nat Rev Immunol*. – 2019. – V. 19 (3). – P. 184–97. DOI: 10.1038/s41577-019-0125-8.

288. Saleh, R. Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy: Role of Tumor-Mediated Immunosuppression / R. Saleh, E. J. Elkord // *Semin Cancer Biol*. – 2020. – V. 65. – P. 13–27. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.07.017

289. Salisbury, T. B. Insulin/Insulin-like growth factors in cancer: new roles for the aryl hydrocarbon receptor, tumor resistance mechanisms, and new blocking strategies / T. D. Salisbury, J. K. Tomblin // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2015. –

V. 6. – P. 12. DOI: 10.3389/fendo.2015.00012.

290. Schaal, C. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers / C. Schaal, S. P. Chellappan // *Mol Cancer Res.* – 2014. – V. 12. – P. 14–23. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0541.

291. Schmid, S. Mechanisms of osimertinib resistance and emerging treatment options / S. Schmid, J. J. N. Li, N. B. Leighl // *Lung Cancer.* – 2020. – V. 147. – P. 123–129. DOI: 10.1016/j.lungcan.2020.07.014.

292. Schoenfeld, A.J. The Evolving Landscape of Resistance to Osimertinib / A. J. Schoenfeld, H. A. Yu // *Journal of Thoracic Oncology.* – 2020. – V. 15 (1). – P. 18–21. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.11.005.

293. Sensitivities to various epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors of uncommon epidermal growth factor receptor mutations L861Q and S768I: What is the optimal epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor? / E. Banno, Y. Togashi, Y. Nakamura [et al.] // *Cancer Sci.* – 2016. – V. 107 (8). – P. 1134–1140. DOI: 10.1111/cas.12980.

294. Sequential Anti-PD1 Therapy Following Dendritic Cell Vaccination Improves Survival in a HER2 Mammary Carcinoma Model and Identifies a Critical Role for CD4 T Cells in Mediating the Response / K. N. Kodumudi, G. Ramamoorthi, C. Snyder [et al.] // *Front Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 1939. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01939.

295. Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer / W. Zhao, J. J. Zhao, L. Zhang [et al.] // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. – V. 8 (9). – P. 14759–14763.

296. Sex-specific, reciprocal regulation of ER α and miR-22 controls muscle lipid metabolism in male mice / J. Schweisgut, C. Schutt, S. Wüst [et al.] // *EMBO J.* – 2017. – V. 36 (9). – P. 1199–1214. DOI: 10.15252/embj.201695988.

297. Shi, Q. Inflammation and the chemical carcinogen benzo[a]pyrene: Partners in crime / Q. Shi, R. W. L. Godschalk, F. J. van Schooten // *Mutat Res Rev Mutat Res.* – 2017. – V. 774. – P. 12–24. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.08.003.

298. Shinde, R. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the

Microenvironment / R. Shinde, T. L. McGaha // Trends Immunol. – 2018. – V. 39 (12). – P. 1005–1020. DOI: 10.1016/j.it.2018.10.010.

299. Shivanna, B. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): A Novel Therapeutic Target for Pulmonary Diseases? / B. Shivanna, C. Chu, B. Moorthy // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23 (3). – P. 1516. DOI: 10.3390/ijms23031516.

300. Siegel, R. L. Cancer statistics / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal // CA Cancer J Clin. – 2018. – Vol. 68. – P. 7–30.

301. Siegel, R. L. Cancer statistics, 2020 / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal // CA Cancer J Clin. – 2020. – V. 70 (1). – P. 7–30.

302. Siegfried, J. M. Estrogen receptor signaling in lung cancer / J. M. Siegfried, P. A. Hershberger, L. P. Stabile // Semin Oncol. – 2009. – V. 36 (6). – P. 524–531. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2009.10.004.

303. Singh, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis / S. Singh, S. Pillai, S. Chellappan // J Oncol. – 2011. – V. 2011. – P. 1–11. DOI: 10.1155/2011/456743.

304. Sisti, J. What proportion of lung cancer in never-smokers can be attributed to known risk factors? / J. Sisti, P. Boffetta // Int J Cancer. – 2012. – V. 131 (2). – P. 265–275. DOI: 10.1002/ijc.27477.

305. Smoking-related O4-ethylthymidine formation in human lung tissue and comparisons with bulky DNA adducts / L. Anna, K. Kovács, E. Gyorffy [et al.] // Mutagenesis. – 2011. – V. 26 (4). – P. 523–527. DOI: 10.1093/mutage/ger011.

306. Sobus, S. L. The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells / S. L. Sobus, G. W. Warren // Cancer. – 2014. – V. 120 (23). – P. 3617–3626. DOI: 10.1002/cncr.28904.

307. Solid Predominant Histologic Subtype in Resected Stage I Lung Adenocarcinoma Is an Independent Predictor of Early, Extrathoracic, Multisite Recurrence and of Poor Postrecurrence Survival / H. Ujiie, K. Kadota, J. E. Chaft [et al.] // J Clin Oncol. – 2015. – Vol. 33 (26). – P. 2877–2884. DOI: 10.1200/JCO.2015.60.9818.

308. Spatiotemporal Analysis of Lung Cancer Histological Types in Kentucky,

1995-2014 / W. J. Christian, N. L. Vanderford, J. McDowell [et al.] // *Cancer Control*. – 2019. – Vol. 26 (1). DOI: 10.1177/1073274819845873.

309. Stapelfeld, C. Sex-specificity in lung cancer risk / C. Stapelfeld, C. Dammann, E. Maser // *Int J Cancer*. – 2020. – V. 146 (9). – P. 2376-2382. DOI: 10.1002/ijc.32716.

310. STAT3 and NF- κ B are Simultaneously Suppressed in Dendritic Cells in Lung Cancer / R. Li, F. Fang, M. Jiang [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – V. 7. – P. 45395. DOI: 10.1038/srep45395.

311. Stejskalova, L. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: Current state of art / L. Stejskalova, Z. Dvorak, P. Pavek // *Curr. Drug Metab*. – 2011. – V. 12. – P. 198–212. DOI: 10.2174/138920011795016818.

312. Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex / J. Lu, H. W. Jeong, N. Kong [et al.] // *PLoS One*. – 2009. – V. 4 (5). – P. 5577. DOI: 10.1371/journal.pone.0005577.

313. Structure and Dynamics of the EGF Receptor as Revealed by Experiments and Simulations and Its Relevance to Non-Small Cell Lung Cancer / M. L. Martin-Fernandez, D. T. Clarke, S. K. Roberts [et al.] // *Cells*. – 2019. – V. 8 (4). – P. 316. DOI: 10.3390/cells8040316.

314. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development / S. Wu, S. Powers, W. Zhu, Y. A. Hannun // *Nature*. – 2016. – V. 529. – P. 43–47. DOI: 10.1038/nature16166.

315. Survival benefit of osimertinib combination therapy in patients with T790M-positive non-small-cell lung cancer refractory to osimertinib treatment / P.-L. Su, J.-S. Tsai, S.-C. Yang [et al.] // *Lung Cancer*. – 2021. – V. 158. – P. 137–145. DOI: 10.1016/j.lungcan.2021.06.014.

316. Systematic review and meta-analysis on the impact of lung cancer screening by low-dose computed tomography / A. Sadate, B. V. Occean, J. P. Beregi [et al.] // *Eur J Cancer*. – 2020. – V. 134. – P. 107–114. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.04.035.

317. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American

Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update / N. Hanna, D. Johnson, S. Temin [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2017. – V. 35 (30). – P. 3484–3515. DOI: 10.1200/JCO.2017.74.6065.

318. Tang, M. Molecular mechanisms involved in dendritic cell dysfunction in cancer / M. Tang, J. Diao, M. S. Catral // *Cell Mol Life Sci.* – 2017. – V. 74 (5). – P. 761–776. DOI: 10.1007/s00018-016-2317-8.

319. Targeting microRNAs: a new action mechanism of natural compounds / Q. Lin, L. Ma, Z. Liu [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8 (9). – P. 15961–15970. DOI: 10.18632/oncotarget.14392.

320. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity / M. Yarchoan, B. A. Johnson^{3rd}, E. R. Lutz [et al.] // *Nat Rev Cancer.* – 2017. – V. 17 (4). – P. 209–222. DOI: 10.1038/nrc.2017.74.

321. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors / D. W. Travis, E. Brambilla, A. G. Nicholson [et al.] // *Journal of Thoracic Oncology.* – 2015. – Vol. 10 (9). – P. 1243–1260. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630.

322. The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90 / N. Tsuji, K. Fukuda, Y. Nagata [et al.] // *FEBS Open Bio.* – 2014. – V. 4. – P. 796–803. DOI: 10.1016/j.fob.2014.09.003.

323. The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Maintenance of Lung Health / N. Guerrina, H. Traboulsi, D. H. Eidelman, C. J. Baglole // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – P. 3882. DOI: 10.3390/ijms19123882.

324. The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy / G. Z. Wang, L. Zhang, X. C. Zhao [et al.] // *Nat Commun.* – 2019. – V. 10 (1). – P. 1125. DOI: 10.1038/s41467-019-08887-7.

325. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway / C. Tomkiewicz, L. Herry, L.-C. Bui [et al.] // *Oncogene.* – 2013. – V. 32 (14). – P. 1811–20. DOI: 10.1038/onc.2012.197.

326. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy / S. E. McGeary, K. S. Lin, C. Y. Shi [et al.] // *Science.* – 2019. – V. 366. – P. 6472. DOI:

10.1126/science.aav1741.

327. The clinical significance of loss of FHIT and PTEN expression in 289 patients with non-small-cell lung cancer / X.-J. Chang, X.-S. Zuo, Z.-T. Wang [et al.] // *Transl. Cancer Res.* – 2016. – V. 5. – P. 294–301.

328. The Clinical Utility of miR-21 and let-7 in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). A Systematic Review and Meta-Analysis / C. Pop-Bica, S. Pintea, L. Magdo [et al.] // *Front Oncol.* – 2020. – V. 10. – P. 516850. DOI: 10.3389/fonc.2020.516850.

329. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients / B. Y. Wang, J. Y. Huang, H. C. Chen [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2020. – V. 146 (1). – P. 43–52. DOI: 10.1007/s00432-019-03079-8.

330. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signaling / T. Virolle, E. D. Adamson, V. Baron [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2001. – V. 3 (12). – P. 1124–1128. DOI: 10.1038/ncb1201-1124.

331. The epidemiology of lung cancer / P. M. Groot, C. C. Wu, B. W. Carter, R. F. Munden // *Transl Lung Cancer Res.* – 2018. – V. 7 (3). – P. 220–233. DOI: 10.21037/tlcr.2018.05.06.

332. The Human Protein Atlas : [website]. – URL: <https://www.proteinatlas.org/> (date of the application: 15.01.2018). – Text : electronic.

333. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival / A. Warth, T. Muley, M. Meister [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2012. – V. 30 (13). – P. 1438–1446. DOI: 10.1200/JCO.2011.37.2185.

334. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells / L. B. Song, J. Li, W. T. Liao [et al.] // *J Clin Invest.* – 2009. – V. 119 (12). – P. 3626–36. DOI: 10.1172/JCI39374.

335. The prognostic value of miR-21 and miR-155 in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis / Y. Wang, J. Li, L. Tong [et al.] // *Jpn J Clin Oncol.* – 2013. – V. 43. – P. 813–820. DOI: 10.1093/jjco/hyt084.

336. The role of microRNA-21 in the onset and progression of cancer / A. Singh, A. K. Singh, R. Giri [et al.] // *Future Med Chem.* – 2021. – V. 13 (21). – P. 1885–1906. DOI: 10.4155/fmc-2021-0096.

337. The Role of miRNA in Tumor Immune Escape and miRNA-Based Therapeutic Strategies / Z. Zhang, Q. Huang, L. Yu [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – V. 12. – P. 807895. DOI: 10.3389/fimmu.2021.807895.

338. The role of TGF-beta1-miR-21-ROS pathway in bystander responses induced by irradiated non-small-cell lung cancer cells / Y. Jiang, X. Chen, W. Tian [et al.] // *Br J Cancer.* – 2014. – V. 111 (4). – P. 772–780. DOI: 10.1038/bjc.2014.368.

339. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer / R. M. Bremnes, L. T. Busund, T. L. Kilvæ [et al.] // *J Thorac Oncol.* – 2016. – V. 11 (6). – P. 789–800. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.01.015.

340. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review) / A. Nakanishi, Y. Kitagishi, Y. Ogura, S. Matsuda. // *Int J Oncol.* – 2014. – V. 44 (6). – P. 1813–9. DOI: 10.3892/ijo.2014.2377.

341. The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: a systematic review with meta-analysis / C. Shao, F. Yang, Z. Qin [et al.] // *BMC Cancer.* – 2019. – V. 19 (1). – P. 1103. DOI: 10.1186/s12885-019-6297-6.

342. Therapeutic Strategies in EGFR Mutant Non-Small Cell Lung Cancer / H. H. Loong, S.-C. S. Kwan, T. S.-K. Mok, Y.-M. Lau // *Curr Treat Options Oncol.* – 2018. – V. 19 (11). – P. 58. DOI: 10.1007/s11864-018-0570-9.

343. Therapy Monitoring of EGFR-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Using ddPCR Multiplex Assays / R. Kock, B. van den Borne, M. Y.-El. Soud [et al.] // *J Mol Diagn.* – 2021. – V. 23 (4). – P. 495–505. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2021.01.003.

344. Third generation EGFR TKIs in EGFR-mutated NSCLC: Where are we now and where are we going / A. Russo, T. Franchina, G. Ricciardi [et al.] // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2017. – V. 117. – P. 38–47. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.07.003.

345. Tobacco biomarkers and genetic/epigenetic analysis to investigate

ethnic/racial differences in lung cancer risk among smokers / S. E. Murphy, S. L. Park, S. Balbo [et al.] // *NPJ Precis Oncol.* – 2018. – V. 2. – P. 17. DOI: 10.1038/s41698-018-0057-y.

346. Tobacco smoking and trends in histological subtypes of female lung cancer at the Cancer Hospital of the Chinese Academy of Medical Sciences over 13 years / Q. Zeng, E. Vogtmann, M. M. Jia [et al.] // *Thorac Cancer.* – 2019. – Vol. 10 (8). – P. 1717–1724. DOI: 10.1111/1759-7714.13141.

347. Torre, L. A. Lung Cancer Statistics / L. A. Torre, R. L. Siegel, A. Jemal // *Adv Exp Med Biol.* – 2016. – V. 893. – P. 1–19. DOI: 10.1007/978-3-319-24223-1_1.

348. Torres, J. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation / J. Torres, R. Pulido // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276 (2). – P. 993-8. DOI: 10.1074/jbc.M009134200.

349. Townsend, E. A. Sex differences and sex steroids in lung health and disease / E. A. Townsend, V. M. Miller, Y. S. Prakash // *Endocr Rev.* – 2012. – V. 33. – P. 1–47. DOI: 10.1210/er.2010-0031.

350. TP53 alterations correlate with response to VEGF/VEGFR inhibitors: implications for targeted therapeutics / J.J. Wheler, F. Janku, A. Naing [et al.] // *Mol Cancer Ther.* – 2016. – V. 15 (10). – P. 2475–2485. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0196.

351. Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations / K. Yoneda, N. Imanishi, Y. Ichiki, F. Tanaka // *J UOEH.* – 2019. – V. 41 (2). – P. 153–163. DOI: 10.7888/juoeh.41.153.

352. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function / J. Zong, A. A. Keskinov, G. V. Shurin, M. R. Shurin. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2016. – V. 65 (7). – P. 821–833. DOI: 10.1007/s00262-016-1820-y.

353. Txnip balances metabolic and growth signaling via PTEN disulfide reduction / S. T. Y. Hui, A. M. Andres, A. K. Miller [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – V. 105 (10). – P. 3921–6. DOI: 10.1073/pnas.0800293105.

354. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and

survival analyses / D. S. Chandrashekar, B. Basher, S. A. H. Balasubramanya [et al.] // *Neoplasia*. – 2017. – V. 19 (8). – P. 649–658. DOI: 10.1016/j.neo.2017.05.002.

355. UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform / D. S. Chandrashekar, S. K. Karthikeyan, P. K. Korla [et al.] // *Neoplasia*. – 2022. – V. 25. – P. 18–27. DOI: 10.1016/j.neo.2022.01.001.

356. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression / L. C. Trotman, X. Wang, A. Alimonti [et al.] // *Cell*. – 2007. – V. 128 (1). – P. 141–56. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.040.

357. Uncommon mutation types of epidermal growth factor receptor and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in Chinese non-small cell lung cancer patients / K. Chen, X. Yu, H. Wang [et al.] // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2017. – V. 80. – P. 1179–1187. DOI: 10.1007/s00280-017-3464-9.

358. Upregulated circRNA ARHGAP10 Predicts an Unfavorable Prognosis in NSCLC through Regulation of the miR-150-5p/GLUT-1 Axis / M. Jin, C. Shi, C. Yang [et al.] // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2019. – V. 18. – P. 219–231. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.08.016.

359. Urban particulate matter down-regulates filaggrin via COX2 expression/PGE2 production leading to skin barrier dysfunction / C. W. Lee, Z. C. Lin, S. C. S. Hu [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 27995. DOI: 10.1038/srep27995.

360. Use of threshold-specific energy model for the prediction of effects of smoking and radon exposure on the risk of lung cancer / R. Böhm, A. Sedlák, M. Bulko, K. Holý // *Radiat Prot Dosimetry*. – 2014. – V. 160 (1-3). – P. 100–103. DOI: 10.1093/rpd/ncu059.

361. Vaccine and immune cell therapy in non-small cell lung cancer / H. Oliveres, C. Caglevic, F. Passiglia [et al.] // *J Thorac Dis*. – 2018. – V. 10 (13). – P. 1602–1614. DOI: 10.21037/jtd.2018.05.134.

362. Vaid, A. K. Overall survival in stage IV EGFR mutation positive NSCLC: Comparing first, second and third generation EGFR TKIs (Review) / A. K. Vaid, A. Gupta, G. Momi // *Int J Oncol*. – 2021. – V. 58 (2). – P. 171–184. DOI: 10.3892/ijo.2021.5168.

363. Van Belzen, I. Immune biomarkers for predicting response to adoptive cell transfer as cancer treatment / I. van Belzen, C. Kesmir // *Immunogenet.* – 2019. – V. 71. – P. 71–86. DOI: 10.1007/s00251-018-1083-1.
364. Vanhaesebroeck, B. PI3K signalling: the path to discovery and understanding / B. Vanhaesebroeck, L. Stephens, P. Hawkins // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 13 (3). – P. 195–203. DOI: 10.1038/nrm3290.
365. Veglia, F. Dendritic cells in cancer: the role revisited / F. Veglia, D. I. Gabrilovich // *Curr Opin Immunol.* – 2017. – V. 45. – P. 43–51. DOI: 10.1016/j.coi.2017.01.002.
366. Vestergaard, H. H. A systematic review of targeted agents for non-small cell lung cancer / H. H. Vestergaard, M. R. Christensen, U. N. Lassen // *Acta Oncol.* – 2018. – V. 57 (2). – P. 176–186. DOI: 10.1080/0284186X.2017.1404634
367. Wajda, A. Epigenetic Regulations of AhR in the Aspect of Immunomodulation / A. Wajda, J. Łapczuk-Romańska, A. Paradowska-Gorycka // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21 (17). – P. 6404. DOI: 10.3390/ijms21176404.
368. Wang, Q. Possible Molecular Mechanisms for the Roles of MicroRNA-21 Played in Lung Cancer / Q. Wang, L. Zhang // *Technol Cancer Res Treat.* – 2019. – Vol. 1. – P. 18. DOI: 10.1177/1533033819875130.
369. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species / J-S. Yang, M. D. Phillips, D. Betel [et al.] // *RNA.* – 2011. – V. 17 (2). – P. 312–326. DOI: 10.1261/rna.2537911.
370. Wood smoke enhances cigarette smoke-induced inflammation by inducing the aryl hydrocarbon receptor repressor in airway epithelial cells / E. G. Awji, H. Chand, S. Bruse [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2015. – V. 52. – P. 377–386. DOI: 10.1165/rcmb.2014-0142OC.
371. Worby, C. A. PTEN / C. A. Worby, J. E. Dixon // *Annu Rev Biochem.* – 2014. – V. 83. – P. 641–69. DOI: 10.1146/annurev-biochem-082411-113907.
372. Yan, K. Osimertinib in EGFR-Mutated Advanced NSCLC / K. Yan // *N Engl J Med.* – 2020. – V. 382 (19). – P. 1863.
373. Yang, P. Lung cancer in never smokers / P. Yang // *Semin Respir Crit*

Care Med. – 2011. – V. 32 (1). – P. 10–21.

374. Yang, W. B. MiR-4299 suppresses non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through modulating PTEN/AKT/PI3K pathway / W. B. Yang, W. P. Zhang, J. L. Shi [et al.] // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2018. – V. 22 (11). – P. 3408–3414. DOI: 10.26355/eurrev_201806_15163.

375. Yu, Y. X. Overexpression of PTEN suppresses non-small-cell lung carcinoma metastasis through inhibition of integrin α V β 6 signaling / Y. X. Yu, Y. Wang, H. Liu // Am J Transl Res. – 2017. – V. 9 (7). – P. 3304–3314.

376. Zaragoza-Ojeda, M. Role of aryl hydrocarbon receptor in central nervous system tumors: Biological and therapeutic implications / M. Zaragoza-Ojeda, E. Apatiga-Vega, F. Arenas-Huertero // Oncol. Lett. – 2021. – V. 21 (6). – P. 460. DOI: 10.3892/ol.2021.12721.

377. Zhou, C. Strategies to improve outcomes of patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer: Review of the literature / C. Zhou, L. D. Yao // J Thorac Oncol. – 2016. – V. 11 (2). – P. 174–186. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.10.002.

378. Zhou, F. Lung cancer in never smokers – the East Asian experience / F. Zhou, C. Zhou // Transl. Lung Cancer Res. – 2018. – V. 7 (4). – P. 450–463. DOI: 10.21037/tlcr.2018.05.14.

379. Zhou, G. Tobacco, air pollution, environmental carcinogenesis, and thoughts on conquering strategies of lung cancer / G. Zhou // Cancer Biol Med. – 2019. – V. 16 (4). – P. 700–713. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0180.

380. Zhou, H. The Development and Function of Dendritic Cell Populations and Their Regulation by miRNAs / H. Zhou, L. J. P. Wu // Cell. – 2017. – V. 8 (7). – P. 501–513. DOI: 10.1007/s13238-017-0398-2.

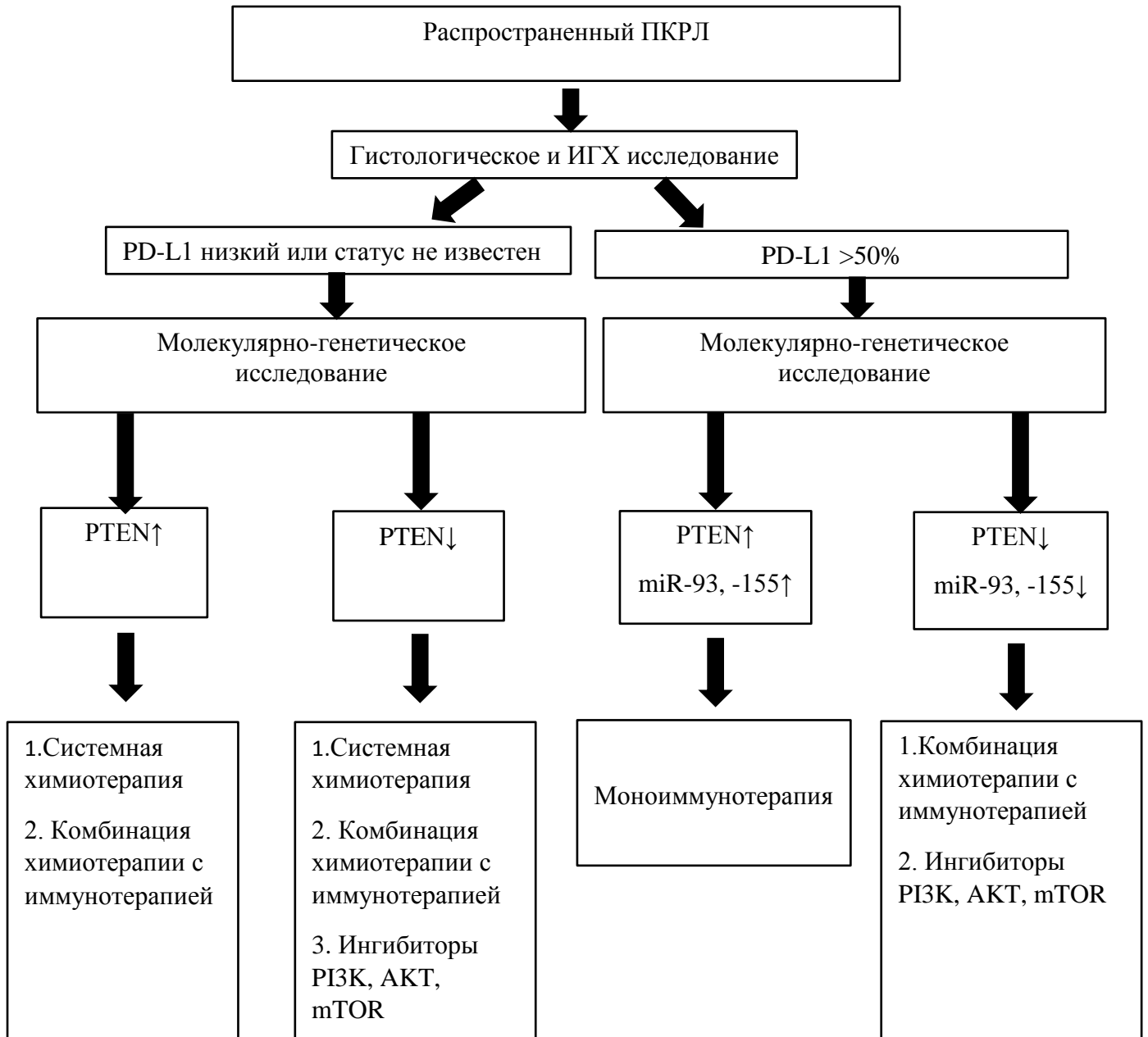
381. Zhu, K. Aryl hydrocarbon receptor pathway: Role, regulation and intervention in atherosclerosis therapy (Review) / K. Zhu, Q. Meng, Z. Zhang [et al.] // Mol Med Rep. – 2019. – V. 20 (6). – P. 4763–4773. DOI: 10.3892/mmr.2019.10748.

382. Zhu, Z. Multiple primary lung cancer displaying different EGFR and PTEN molecular profiles / Z. Zhu, T. Yu, Y. Chai // Oncotarget. – 2016. – V. 7 (49). – P. 81969–81971. DOI: 10.18632/oncotarget.13046.

383. Zou, W. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers and combinations / W Zou, J. D. Wolchok, L. Chen // *Sci. Transl. Med.* – 2016. –V. 8 (328). – P. 328–324. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad7118.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(информационное)

**Потенциальный алгоритм диагностики и лечения плоскоклеточного рака
легкого**



ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(информационное)

Потенциальный алгоритм диагностики и лечения аденокарциномы легкого

