ГЕНЕТИКА, ПРОТЕОМИКА И МЕТАБОЛОМИКА
GENETICS, PROTEOMICS AND METABOLOMICS

АКТИВАЦИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОСПАЛЕНИЕМ, В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РАЗВИТИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Лапкина Е.З.[1], Зинченко И.С.[1], Бондар Е.И.[2,3], Сергеева Е.Ю.[1], Рукша Т.Г.[1]

[1] Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. П. Железняка, 1, Россия)
[2] Сибирский Федеральный университет (660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, Россия)
[3] Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук (660036 г. Красноярск, ул. Академгородок, 50, Россия)

Автор, ответственный за переписку: **Рукша Татьяна Геннадьевна,** e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. *Одной из наиболее значимых проблем при химиотерапии злокачественных новообразований является развитие резистентности опухолей. Среди многочисленных внутриклеточных процессов, активирующихся при развитии лекарственной устойчивости новообразований, наблюдается усиление провоспалительных сигнальных механизмов. Процесс воспаления может играть одну из ключевых ролей и в формировании резистентности меланомы к химиотерапевтическому препарату дакарбазину.*

Цель исследования. *На основе транскриптомного профилирования с применением высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа охарактеризовать дифференциально экспрессируемые гены и сигнальные пути в клетках меланомы, устойчивые к воздействию дакарбазина.*

Методы. *Влияние дакарбазина на экспрессию генов клеток меланомы изучали на модели меланомы C57Bl6/B16 in vivo. Мышам на 8, 10 и 12 день после трансплантации опухоли меланомы вводили внутрибрюшинно дакарбазин (50 мг/кг). Из опухолевых узлов на 14 сутки после трансплантации меланомы животным производили экстрагирование общей РНК и осуществляли анализ транскриптома методом секвенирования нового поколения. На основе биоинформатического анализа определялись дифференциально экспрессируемые гены и внутриклеточные процессы, опосредуемые дифференциально экспрессируемыми генами.*

Результаты. *Из 21 дифференциально экспрессируемого гена, повышение экспрессии наблюдалось у 10 генов, снижение экспрессионной активности – у 11 генов, ассоциированных с процессом воспаления и относящихся согласно данным биоинформатического анализа к сигнальным каскадам «Comprehensive IL-17A signaling», «Oxidative stress and redox pathway», «TNF alpha NF-kB signaling pathway».*

Заключение. *В химиорезистентных опухолевых клетках меланомы B16 изменяется экспрессия генов, которые являются компонентами сигнальных путей, ассоциированных с воспалительным процессом.*

Ключевые слова: *меланома B16, дакарабазин, транскриптом, химиорезистентность*

Статья поступила: 10.02.2025
Статья принята: 25.06.2025
Статья опубликована: 17.07.2025

Для цитирования: Лапкина Е.З., Зинченко И.С., Бондар Е.И., Сергеева Е.Ю., Рукша Т.Г. Активация внутриклеточных сигнальных механизмов, ассоциированных с воспалением, в опухолевых клетках при развитии лекарственной устойчивости. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(3): 49-58. doi: 10.29413/ABS.2025-10.3.5

INFLAMMATION-ASSOCIATED SIGNAL PATHWAYS ACTIVATION DURING DRUG RESISTANCE DEVELOPMENT IN CANCER CELLS

Lapkina E.Z.[1], **Zinchenko I.S.**[1], **Bondar E.I.**[2,3], **Sergeeva E.Yu.**[1], **Ruksha T.G.**[1]

[1] Professor V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University (P. Zeleznyak str., 1, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation)
[2] Siberian Federal University (Svobodny Ave., 79, Krasnoyarsk 660041, Russian Federation)
[3] Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Akademgorodok Str., 50, Krasnoyarsk 660036, Russian Federation)

Corresponding author:
Tatiana G. Ruksha,
e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru

RESUME

Background. *Cancer drug resistance represents an obvious problem in clinical oncology. Among various intracellular pathways activated during drug resistance development, proinflammatory cascades considered to be involved as well. The inflammatory process may also play a key role in the formation of melanoma resistance to the chemotherapeutic agent dacarbazine.*
The aim. *To characterize differentially expressed genes and signaling pathways associated with cancer resistance to alkylating agent dacarbazine in melanoma cells in vivo with the use of high-throughput sequencing for transcriptomic profiling.*
Methods. *The effect of dacarbazine on melanoma cell gene expression was studied in a C57Bl6/B16 melanoma model in vivo. Mice were injected intraperitoneally with dacarbazine (50 mg/kg) on days 8, 10, and 12 after melanoma tumor transplantation. Total RNA was extracted from tumor nodes on the 14th day after melanoma transplantation to animals and the transcriptome was analyzed using a next generation sequencing method. Bioinformatic analysis was applied to identify differentially expressed genes and corresponding signal pathways.*
Results. *Twenty one differentially expressed genes were identified, of which an increase in expression was observed in 10 genes, and a decrease in expression activity was observed in 11 genes involved in signaling pathways associated with the inflammatory process "Comprehensive IL-17A signaling", "Oxidative stress and redox pathway", "TNF alpha NF-kB signaling pathway".*
Conclusions. *Dacarbazine alters the expression of genes regulating inflammation, which may play a role in the development of chemoresistance.*

Key words: *melanoma B16, dacarbazine, transcriptome, chemoresistance*

Received: 10.02.2025
Accepted: 25.06.2025
Published: 17.07.2025

For citation: Lapkina E.Z., Zinchenko I.S., Bondar E.I., Sergeeva E.Yu., Ruksha T.G. Inflammation-associated signal pathways activation during drug resistance development in cancer cells. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(3): 49-58. doi: 10.29413/ABS.2025-10.3.5

ВВЕДЕНИЕ

Меланома кожи является одним из самых агрессивных злокачественных новообразований, характерной особенностью которого является быстрое развитие метастазирования. Наряду с новыми стратегиями лечения меланомы, в частности, иммунотерапией, сохраняется применение химиотерапевтических средств. Одной из наиболее значимых проблем при химиотерапии онкологических заболеваний является развитие резистентности к лекарственным препаратам, поэтому поиск подходов, позволяющих предотвратить эту проблему, крайне важен [1]. Вместе с тем, использование химиотерапевтических агентов *in vitro, in vivo* позволяет исследовать новые механизмы лекарственной устойчивости новообразований.

Химиотерапевтическое средство дакарбазин по своему действию относится к алкилирующим агентам. Цитотоксическая активность дакарбазина обусловлена его метаболизмом при помощи цитохрома Р-450 гепатоцитов в 5-аминоимидазол-4-карбоксамид, который алкилирует ДНК, а также и метил-катион, способный метилировать ДНК [2]. Метилирование ДНК – один из механизмов эпигенетической регуляции активности генов. Известно, что посредством этой регуляции, включающей модификацию гистонов, метилирование ДНК и контроль экспрессии микроРНК, происходит модуляция транскрипции, что, в конечном итоге, играет важную роль в ключевых биологических процессах, включая пролиферацию, гибель клеток, ангиогенез и воспаление [3]. Существует множество данных, подтверждающих важную роль воспаления в канцерогенезе, опухолевой прогрессии и метастазировании [4, 5, 6]. Предполагают, что воспаление может играть важную роль и в формировании резистентности к химиотерапии, но механизмы, лежащие в основе этого, до конца не ясны [1].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Охарактеризовать механизмы лекарственной устойчивости клеток меланомы к алкилирующему противоопухолевому агенту дакарбазину.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Линия мышей C57Bl6 широко используется в онкологических исследованиях, так как является гомозиготной по аллелю гена *Tyrc* (чёрный окрас шерсти), что способствует развитию пигментных опухолей, и совместима с сингенной клеточной линией меланомы B16, что позволяет формировать модель подкожной ксенотрансплантации. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 116/2022 от 27.12.2022 г.). Манипуляции с животными осуществляли в соответствии с правилами, изложенными в Руководстве Национального института здравоохранения по уходу за лабораторными животными и их использованию [7].

Мыши-самки линии C57Bl6, возраст 6–8 недель, были получены из питомника лабораторных животных «Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Санкт-Петербург, Россия). Перед экспериментом мыши прошли адаптационный период к условиям вивария в течение 2 недель, средний вес животных составлял 16 г.

Животные содержались в виварии при комнатной температуре и естественном освещении со свободным доступом к пище и воде. Животные были рандомно разделены на контрольную (n = 12) и опытную группы (n = 12). Животным опытной группы вводился дакарбазин согласно протоколу.

Клеточная линия B16-F10

Культура клеток меланомы B16-F10 была получена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск). В эксперименте использовали клетки меланомы, которые не подвергались более чем 50 пассажам с момента получения культуры из банка клеточных культур. В процессе культивирования регулярно оценивали морфологию клеток для исключения контаминации. Перед началом эксперимента клеточную культуру проверили на наличие микоплазменной инфекции с помощью ПЦР в реальном времени, используя набор Mycо Real-Time (Eurogen, Москва, Россия). Клетки культивировали в DMEM (PanEco) с 10 % FBS (HyClone) и 1 % антибиотиками (Gibco) в условиях 37°C, 5 % CO_2 (Sanyo MSO-5AC).

Модель меланомы in vivo

Модель меланомы формировали путем подкожного введения клеток меланомы линии B16 в концентрации $1,5 \times 10^6$ в 0,5 мл раствора Хенкса (Gibco, ThermoFisher Scientific, USA) в боковую поверхность живота до формирования солидной опухоли 20 мм. Впоследствии ткань сформировавшегося опухолевого узла массой 1 г промывали стерильной средой 199 с солями Хенкса и L-глутамином и гомогенизировали с раствором Хенкса (1:10). Далее производили трансплантацию солидной опухоли меланомы линии B16 животным путём подкожного введения в боковую поверхность живота взвеси опухолевой ткани, содержащей $1,5 \times 10^6$ клеток меланомы. Для оценки динамики роста опухоли производили пальпацию опухолевого узла после трансплантации клеток меланомы, а с 7 суток после трансплантации клеток меланомы ежедневно проводили ежедневные линейные размеры опухоли в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Протокол введения дакарбазина мышам с меланомой B16

На 8, 10 и 12 день после трансплантации опухоли животным контрольной группы вводили внутрибрюшинно 250 мл фосфатного буфера, а животным опытной группы – раствор дакарбазина (Sigma-Aldrich, USA) в фосфатном буфере в концентрации 50 мг на кг веса животного. На 14 день была проведена эвтаназия

животных контрольной и опытной группы с забором ткани опухоли для дальнейшего исследования. Животных после эвтаназии визуально осматривали. При вскрытии животных проводили оценку внутренних органов: цвета, формы, консистенции.

Анализ транскриптома методом секвенирования нового поколения

Экстрагирование тотальной РНК, полученной от животных контрольной и опытной группы, проводилось с использованием TRIzol® reagent (Qiagen, Hilden, Germany) и набора RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany). К выделенной РНК был добавлен ингибитор РНК-аз RiboLock (Thermofisher, USA). Качество выделенной РНК оценивали на приборе Qsep400 instrument (BiOptic, New Taipei City, Taiwan) с использованием набора RNA Cartridge Kit R1-O-4CH (BiOptic, New Taipei City, Taiwan). Количество выделенной РНК было измерено с помощью Qubit RNA High Broad Range kit (Thermo Fisher Scientific, Eugene, USA).

Приготовление РНК - библиотек и секвенирование нового поколения были выполнены в компании «Геномед» (Russia). Для секвенирования транскриптома конструирование библиотеки было осуществлено в несколько этапов. Для обогащения mRNA-фракции согласно poly-A принципу, были использованы частицы с poly-T tails (Shenzhen, China), к которым было добавлено 200 нг общей РНК. Далее, молекулы мРНК были фрагментированы до малых размеров (300 нуклеотидов). Обратная транскрипция на этих фрагментах была выполнена с использованием рандомных праймеров (Shenzhen, China).

Вторая цепь cDNA была синтезирована с dUTP вместо dTTP. Получившаяся в результате двойная цепь cDNA была подвергнута конечному восстановлению и 3'-конец полиаденилированию (Shenzhen, China), далее было выполнено лигирование адаптера (Shenzhen, China). Следующим шагом было расщепление меченной урацилом второй цепи, используя фермент урацил-ДНК-гликозидазу (UDG) (Shenzhen, China), с последующей ПЦР амплификацией (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, Eugene, USA).

Контроль качества библиотек был выполнен с помощью Qsep400 (BiOptic, New Taipei City, Taiwan). Затем, готовые библиотеки подвергались циклизации, амплификации для создания наноболов и секвенированию, используя DNBSeq технологию на приборе DNBSeq G-400 t (MGI, Shenzhen, China) в режиме парноконцевого секвенирования длиной 100 п.н. с генерацией не менее 40 млн. данных на образец. Данные с последовательностями адаптера или последовательностями низкого качества были отфильтрованы с помощью программного обеспечения SOAPnuke (BGI, Shenzhen, China). В рамках биоинформатического анализа качество прочтения данных оценивали с помощью FastQC [8]. Риды были картированы на сборке GRCm39 эталонного генома Mus musculus с использованием HISAT2, картированные риды были количественно оценены с использованием htseq-count. Дифференциально экспрессируемые гены были идентифицированы на основе отрицательного биномиального распределения с использованием DESeq2 и в дальнейшем использованы для идентификации сигнальных путей посредством биоинформатического ресурса Panther GO (Institute for Systems Biology, Seattle, USA).

Статистический анализ

Сравнение результатов секвенирования генома исследуемых образцов было выполнено с использованием теста ANOVA. P-value рассчитывали с поправкой на множественность по методу Бенджамина – Ходжберга (FDR).

РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью высокопроизводительного секвенирования нового поколения был выполнен транскриптомный анализ контрольных и опытных образцов первичной опухоли меланомы B16. Согласно результатам биоинформатического анализа, был выявлен 21 дифференциально экспрессируемый ген, из которых повышение экспрессии наблюдалось у 10 генов (табл. 1), снижение экспрессионной активности – у 11 генов (табл. 2).

Сопоставление полученных результатов с литературными данными показало, что все идентифицированные в нашем исследовании сигнальные пути, компонентами которых являлись дифференциально экспрессируемые гены, играют важную роль в регуляции воспаления и ассоциированных с ним процессов, что может иметь критическое значение для развития химиорезистентности.

Так, нами установлено, что к числу генов с повышенной экспрессией, ассоциированных с сигнальным путем «Comprehensive IL-17A signaling» относились: *HSPA1B, MKI67, PAK3, HYOU1*.

Ген *HSPA1B* кодирует белок, являющийся членом 1B семейства белков теплового шока A (Hsp 70). Ранее было показано, что повышение экспрессии *HSPA1B* коррелировало с усилением активности сигнального пути IL-17, что приводило к усилению воспаления за счет изменения продукции провоспалительных цитокинов и иммунного ответа [9]. Следовательно, можно предположить, что установленное нами повышение экспрессии *HSPA1B* может быть ассоциировано с развитием воспаления.

Еще один гиперэкспрессируемый ген *MKI67* кодирует белок, являющийся маркером пролиферации клеток. В частности, было отмечено, что при развитии воспалительных процессов повышение активности сигнального пути IL-17 сопровождалось повышением экспрессии *MKI67* [10], что возможно, связано с повышением пролиферации лейкоцитов, играющих ключевую роль в иммунных реакциях и фагоцитозе при воспалении.

Известно, что при активации IL-17 происходит повышение продукции свободных радикалов, индуцируя окислительный стресс [11]. Гиперактивация *PAK3*, гена сигнального пути IL-17, повышение экспрессии которого выявлено в нашей работе, ранее характеризовалась как коррелирующая с усилением повреждения,

вызванного окислительным стрессом, согласно данным Chen et al [12]. Экстраполируя этот факт на наше исследование, стоит предположить, что полученный нами результат может свидетельствовать об усилении окислительного стресса и развитии воспаления. Действительно, согласно литературным данным, одним из ключевых эффектов химиотерапевтических агентов является активация окислительного стресса [13].

Кодируемый геном *HYOU1* белок относится к семейству белков теплового шока Hsp 70. Он активируется и играет важную роль во внутриклеточных ответах на стресс, особенно при гипоксии [14]. Известна тесная связь между гипоксией и окислительным стрессом, когда происходит усиление продукции свободных радикалов поврежденными при гипоксии митохондриями. Таким образом, установленное нами повышение экспрессии *HYOU1* может быть ассоциировано с одним из эффектов активации сигнального пути IL-17 в рамках промоции воспаления, а именно, индукцией окислительного стресса.

ТАБЛИЦА 1

ГЕНЫ С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, В КОТОРЫХ ОНИ ЗАДЕЙСТВОВАНЫ, В ТКАНИ МЕЛАНОМЫ B16 ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ДАКАРБАЗИНОМ

TABLE 1

OVEREXPRESSED GENES AND SIGNALING PATHWAYS ENRICHED BY DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN B16 MELANOMA TUMOR UNDER DACARBAZINE TREATMENT

№	Процесс/сигнальный путь	Общее количество генов с дифференциальной экспрессией	Дифференциально экспрессируемые гены	FDR
1	Comprehensive IL-17A signaling/ Комплексная сигнализация ИЛ-17А	9	*HSPA1B* *MKI67* *PAK3* *HYOU1*	0,00032 0,000159 0,001686 1,26E–08
2	Oxidative stress and redox pathway/ сигнализация окислительного стресса и окислительно-восстановительнных процессов	5	*ABCC2*	3,78E–09
3	TNF alpha NF-kB signaling pathway/ Сигнальный путь ФНО-α и NF-kB	7	*PML* *USP2* *NKIRAS1* *HSP90* *TRAF4*	0,001938 0,000102 6,41E–05 0,000401 0,000291

ТАБЛИЦА 2

ГЕНЫ С ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, В КОТОРЫХ ОНИ ЗАДЕЙСТВОВАНЫ, В ТКАНИ МЕЛАНОМЫ B16 ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ДАКАРБАЗИНОМ

TABLE 2

DOWNEXPRESSED GENES AND SIGNALING PATHWAYS ENRICHED BY DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN B16 MELANOMA TUMOR UNDER DACARBAZINE TREATMENT

№	Процесс/сигнальный путь	Общее количество генов с дифференциальной экспрессией	Дифференциально экспрессируемые гены	FDR
1	Comprehensive IL-17A signaling/ Комплексная сигнализация ИЛ-17А	9	*PDGFB* *HBB-BS* *TGFB1* *SMAD6* *HBB-BT*	0,000782 0,001585 0,001541 0,000152 0,001474
2	Oxidative stress and redox pathway/ сигнализация окислительного стресса и окислительно-восстановительнных процессов	5	*S100A8* *S100A9* *TXNRD3* *SLC7A11*	4,69E–06 4,60E–06 3,37E–06 4,55E–05
3	TNF alpha NF-kB signaling pathway/Сигнальный путь ФНО-α и NF-kB	7	*TNFRSF8* *KCNQ1*	0,000221 0,000762

Следует отметить, что в числе дифференциально экспрессируемых генов были гены, не ассоциированные напрямую с воспалением, а непосредственно связанные с чувствительностью к химиотерапевтическому агенту. Так, нами выявлено повышение экспрессии гена *ABCC2*, ассоциированного с сигнальным механизмом «Oxidative stress and redox pathway». *ABCC2* является АТФ-связывающим транспортным белком, принимающим участие в транспорте молекул, в том числе и химиотерапевтических препаратов, через мембраны клетки. Установлено, что повышение экспрессии *ABCC2* может быть ассоциировано с повышением выживаемости клеток при воздействии противоопухолевых препаратов [15].

Нами показано, что ассоциированные с сигнальным путем «TNF alpha NF-kB signaling pathway» гены *PML, USP2, NKIRAS1, HSP90, TRAF4* тоже характеризовались повышенным уровнем экспрессии при воздействии дакарбазином. Известно, что ген *PML*, кодирующий соответствующий белок, играет важную роль в регуляции сигнального каскада NF-kB, модулируя процесс воспаления. Это позволяет нам предположить, что выявленное нами повышение экспрессии этого гена ассоциировано с активацией NF-kB и последующим развитием воспаления [16].

Еще один выявленный нами гиперэкспрессируемый ген *USP2* кодирует белок, принадлежащий к семейству деубиквитинирующих ферментов (суперсемейство C19 пептидаз). Показано, что повышение экспрессии этого гена способствует воспалению посредством деубиквитинирования, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухоли 2 (TRAF2) [17]. Кроме того, повышение экспрессии *USP2* ассоциировано с ингибированием апоптоза, что опосредуется сигнальным каскадом TNF alpha- [14] и может соотноситься с развитием избегания апоптоза опухолевыми клетками и, как следствие, формированием лекарственной устойчивости.

NKIRAS1 изменяет активность транскрипционного фактора NF-kB посредством предотвращения деградации белка-ингибитора-β NF-kB, что играет важную роль в промоции воспалительного процесса [18]. В частности, известно, что инактивация белка, кодируемого *HSP90,* приводит к снижению активности сигнального пути NF-kB [15]. Поэтому установленная нами гиперэкспрессия *HSP90*, возможно, связана с активацией воспаления за счет повышения экспрессии NF-kB, одного из ключевых индукторов воспалительного процесса [19]. *TRAF4* является членом семейства факторов, ассоциированных с TNF рецептором (TRAF) и известен как негативный регулятор NF-kB, в этой связи, возможно, что установленное нами повышение его экспрессии активирует NF-kB [20].

Наряду с повышением экспрессии ряда генов сигнальных путей «Comprehensive IL-17A signaling», «Oxidative stress and redox pathway», «TNF alpha NF-kB signaling pathway», нами установлено снижение уровня экспрессии ряда генов вышеупомянутых сигнальных каскадов. Так, показано снижение активности таких генов сигнального пути «Comprehensive IL-17A signaling», как *PDGFB, HBB-BS, TGFB1, SMAD6* и *HBB-BT.*

Снижение экспрессии генов *HBB-BS* и *HBB-BT*, кодирующих субъединицы гемоглобина, может способствовать изменению редокс-баланса, играющего важную роль при воспалении, за счет изменения выраженности инактивации прооксидантов, связывания кислорода гемоглобином, метаболизма пероксида водорода, изменения активности оксидоредуктазы [21]. Таким образом, выявленное нами понижение экспрессии этих генов, возможно, имеет значение в контексте упомянутого ранее факта, что IL-17-сигналинг осуществляет промоцию окислительного стресса и воспаления.

TGFB1 кодирует белок-лиганд, принадлежащий суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (TGF-beta), который взаимодействует с различными рецепторами TGF-beta, принимая участие в регуляции множества важнейших клеточных процессов. Показано, что существует обратная корреляция между экспрессией этого гена и активностью сигнального пути IL-17 [22], поэтому снижение экспрессии этого гена в нашем исследовании, возможно, соотносится с активацией IL-17-сигналинга.

Развитие окислительного стресса сопровождается повышением продукции свободных радикалов, что способствует воспалению за счет активации ряда сигнальных путей, которые могут также принимать участие в химиорезистентности. К числу генов сигнального пути «Oxidative stress and redox pathway», экспрессия которых при воздействии дакарбазина снижалась, относятся *S100A8, S100A9, TXNRD3* и *SLC7A11*.

S100A8 и *S100A9* кодируют белки семейства S100, способные связывать молекулы цинка и кальция [23]. Белки, кодируемые этими генами, обладают как про-, так и противовоспалительными эффектами. В контексте нашего исследования важно отметить, что они могут супрессировать развитие окислительного стресса, обладая способностью инактивировать прооксиданты [24]. Таким образом, снижение экспрессии этих генов под воздействием дакарбазина тоже может соответствовать усилению окислительного стресса.

TXNRD3 кодирует белок, относящийся к семейству пиридин-нуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаз, который обладает активностью глутатионредуктазы, поддерживая пул восстановленного глутатиона, это играет важную роль в антиоксидантной защите и предотвращении развития окислительного стресса [25]. Поэтому выявленное нами снижение экспрессии этого гена является еще одним фактором, способствующим окислительному стрессу.

Известно, что белок, кодируемый геном *SLC7A11,* является компонентом гетеродимерной натрий-независимой анионной транспортной системы аминокислот и играет значительную роль в поддержании уровня внутриклеточного глутатиона и предотвращении окислительного стресса, который, как было упомянуто ранее, способствует воспалению и, возможно, химиорезистентности [26].

Нами установлено, что воздействие дакарбазина приводило к снижению экспрессии генов *TNFRSF8* и *KCNQ1*, ассоциированных с сигнальным каскадом «NF

alpha NF-kB signaling pathway». Ген *TNFRSF8* кодирует белок, относящийся к суперсемейству рецепторов TNF, способный активировать фактор транскрипции NF-kB. Интересно отметить, что NF-kB, с одной стороны, является одним из ключевых инициаторов воспаления, но снижение его активности тоже может играть определенную роль в пролонгации хронического воспалительного процесса за счет снижения активности иммунного ответа вследствие специфического истощения $CD8^+$ Т-лимфоцитов [27]. *KCNQ1* кодирует белок, являющийся структурным компонентом калиевых каналов. При воспалении описано снижение экспрессии *KCNQ1*, следовательно, выявленная нами пониженная экспрессия *KCNQ1* в клетках меланомы после воздействия дакарбазином, возможно, является одним из маркеров развивающегося при действии дакарбазина ответа на повреждение [28].

В идентифицированных дифференциально экспрессируемых генах были выделены те, которые обладают наибольшей экспрессией для представления в виде тепловой карты (Рис. 1).

По результатам представленной тепловой карты отмечена гиперэкспрессия гена *HSP90,* который ассоциирован с активацией сигнального каскада NF alpha NF-kB и гиперэкспрессия *TRAF4, HYOU1, MKI67*, которые ассоциированы с активацией комплексной сигнализации ИЛ-17А после проведения противоопухолевой терапии дакарбазином.

Таким образом, анализируя эффекты генов с измененной экспрессией выявленных нами сигнальных путей, следует отметить, что, в контексте развития лекарственной устойчивости под действием дакарбазина, выявляется тенденция к инициации воспаления, характеризующаяся развитием окислительного стресса, повышением экспрессии IL-17 и активацией фактора транскрипции NF-kB.

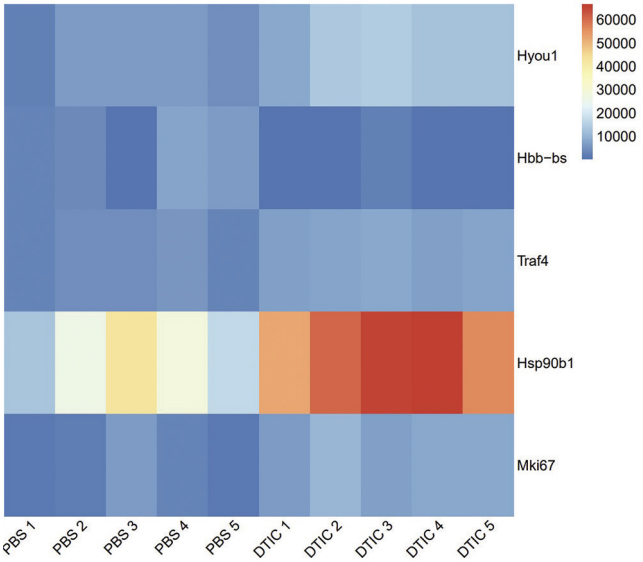

РИС. 1.
Тепловая карта для дифференциально экспрессируемых генов, ассоциированных с воспалением в тканях меланомы B16, после проведения противоопухолевой терапии дакарбазином

FIG. 1.
Heat map for differentially expressed genes associated with inflammation in B16 melanoma tissues under dacarbazine antitumor therapy

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что экспериментальная терапия дакарбазином на модели меланомы B16 *in vivo* не приводила к изменению динамики роста опухоли [29], что, предположительно, обусловлено быстрым формированием устойчивости к химиопрепарату. Описан целый ряд причин, способствующих развитию химиорезистентности, среди которых важное место занимает активация провоспалительных внутриклеточных каскадов как реакция опухолевых клеток на повреждение, вызываемое химиотерапевтическими агентами. Согласно биоинформатическому анализу, идентифицировано три сигнальных пути, ассоциированных с воспалением, в которых отмечалось участие дифференциально экспрессируемых генов в клетках меланомы, подверженных воздействию алкилирующим агентом дакарбазином: «Comprehensive IL-17A signaling», «Oxidative stress and redox pathway», «TNF alpha NF-kB signaling pathway».

Существует целый ряд процессов, связанных с воспалением, которые могут приводить к лекарственной резистентности. К их числу относятся 1) изменения транспорта и метаболизма лекарственных средств, 2) инициация специфического механизма, восстанавливающего поврежденную ДНК (DNA damage response), 3) активация адаптивных ответов клеток, при которой происходит усиление активности различных сигнальных каскадов, избегание апоптоза, 4) аутофагия. Кроме того, важную роль в развитии химиорезистентности при воспалении играют изменения опухолевого микроокружения, включающие 5) окислительный стресс и 6) дисфункцию иммунной системы [1].

В нашей работе выявлено изменение экспрессии генов, ассоциированных с вышеупомянутыми процессами. Так, установленное нами повышение активности гена *ABCC2*, кодирующего белок семейства ABC-транспортеров, может способствовать неэффективности дакарбазина вследствие повышения эффлюкса лекарственного препарата из клетки и, как следствие, отсутствию клинического эффекта.

Усиление метаболизма лекарственного средства может быть обусловлено повышением активности белков семейства цитохромов P-450 (CYPs). Известно, что биотрансформация эндогенных и экзогенных веществ, включая препараты химиотерапии, происходит в системе микросомальных оксидаз гепатоцитов на цитохромах этого семейства. В свою очередь, TNFα способен усиливать метаболическую активность CYPs [30]. В опытной экспериментальной группе нами выявлено повышение экспрессии *USP2* прямо коррелирующее с экспрессией TNFα, результатом которой может стать снижение чувствительности к действию дакарбазина.

В нашей работе показано, что воздействие дакарбазина модулирует «Расширенный сигналинг ИЛ-17А». Действительно, Cao et al была установлена позитивная корреляция между экспрессией IL-17 и инициацией специфического механизма, восстанавливающего поврежденную ДНК, о котором было упомянуто выше [31].

Как уже подчеркивалось ранее, ингибирование апоптоза опухолевых клеток при действии алкилирующими агентами тоже играет важную роль в формировании устойчивости к химиотерапии. При этом происходит активация ряда антиапоптотических механизмов, в частности, ассоциированных с белками семейств Bcl-2 и IAPs [32]. В нашей работе мы установили снижение экспрессии *TGFB1, S100* и повышение экспрессии *PAK3*, что ассоциировано, согласно описанным ранее функциям этих белков, с ингибированием апоптоза [9, 10, 22].

Окислительный стресс и снижение активности иммунного ответа также могут приводить к отсутствию эффекта при химиотерапии. Существует взаимосвязь между воспалением и окислительным стрессом. Известно, что воспаление способствует развитию окислительного стресса, а окислительный стресс, в свою очередь, играет важную роль в активации воспаления. Свободные радикалы, уровень которых при окислительном стрессе повышается, могут индуцировать химиорезистентность за счет активации таких факторов транскрипции, как NF-*κ*B, Nrf2, c-Jun, HIF-1*α* [1]. Каждый из этих транскрипционных факторов может вносить свой вклад в развитие химиорезистентности, в частности, NF-*κ*B, преимущественно, за счет дальнейшей промоции воспаления, Nrf2, посредством активации антиоксидантных систем [33], и, безусловно, посредством усиления репарации ДНК, что опосредуется, в том числе, транскрипционным фактором c-Jun [34]. Роль HIF-1*α* в формировании лекарственной устойчивости может быть связана с метаболическим перепрограммированием опухолевых клеток, ассоциированном с гипоксия-зависимой прогрессией опухоли [35].

В нашем исследовании выявлено снижение экспрессии генов *HBB-BS, HBB-BT*, ассоциированное с усилением прооксидантной активности и *TXNRD3, SLC7A11*, коррелирующее со снижением уровня важного антиоксиданта – восстановленного глутатиона, что тоже может приводить к развитию окислительного стресса и активации свободными радикалами упомянутых выше факторов транскрипции и сигнальных путей, способствующих химиорезистентности.

Таким образом, воздействие на клетки меланомы дакарбазином индуцирует изменения в экспрессии генов, связанных не только с регуляцией воспалительных процессов, но и с молекулярными механизмами канцерогенеза, включая формирование лекарственной устойчивости в опухолевых клетках [36] (Рис. 2).

Полученные результаты, учитывающие многофакторные изменения в опухолевых клетках после воздействия алкилирующими агентами, важны для разработки новых комбинированных подходов с целью преодоления лекарственной резистентности.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lu S, Li Y, Zhu C, Wang W, Zhou Y. Managing Cancer Drug Resistance from the Perspective of Inflammation. *J Oncol.* 2022; 19: 3426407. doi: 10.1155/2022/3426407

2. Yeh YW, Hsu TW, Su YH, Wang CH, Liao PH, Chiu CF, et al. Silencing of Dicer enhances dacarbazine resistance in melanoma cells by inhibiting ADSL expression. *Aging*

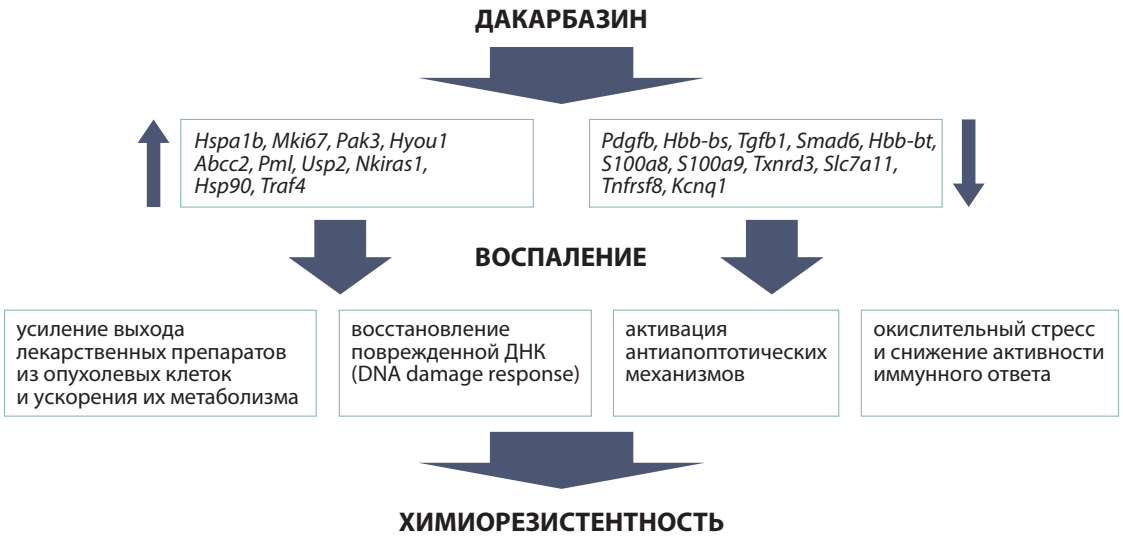

РИС. 2.
Предположительный механизм развития химиорезистентности при воздействии дакарбазина у мышей с меланомой B16

FIG. 2.
The proposed mechanism of development of chemoresistance under the influence of dacarbazine in mice with melanoma BA16

(Albany NY). 2023; 15(22): 12873-12889. doi: 10.18632/aging.205207

3. Deng Q, Gao Y, Wang Y, Mao J, Yan Y, Yang Z, et al. LSD1 inhibition by tranylcypromine hydrochloride reduces alkali burn-induced corneal neovascularization and ferroptosis by suppressing HIF-1α pathway. *Front Pharmacol.* 2024; 15: 1411513. doi: 10.3389/fphar.2024.1411513

4. Артюхов И.П., Гаврилюк Д.В., Дыхно Ю.А., Рукша Т.Г. Заболеваемость меланомой кожи взрослого населения Красноярского края. *Сибирское медицинское обозрение*. 2013; 6(84): 37–42. [Artyukhov I.P., Gavrilyuk D.V., Dyhno Yu.A., Ruksha T.G. The incidence of skin melanoma in the adult population of the Krasnoyarsk Territory. *Siberian Medical Review*. 2013; 6(84): 37–42. (In Russ.)].

5. Nishida A, Andoh A. The role of inflammation in cancer: mechanisms of tumor initiation, progression, and metastasis. *Cells.* 2025; 14(7): 488. doi: 10.3390/cells14070488

6. Ohara Y, Valenzuela P, Hussain SP. The interactive role of inflammatory mediators and metabolic reprogramming in pancreatic cancer. *Trends Cancer.* 2022; 8(7): 556-569. doi: 10.1016/j.trecan.2022.03.004

7. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. doi: 10.17226/12910

8. FASTQC. URL: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ [date of access: February 1, 2025].

9. Wang Q, Shen Y, Hu H, Fan C, Zhang A, Ding R, et al. Systematic Transcriptome Analysis of Noise-Induced Hearing Loss Pathogenesis Suggests Inflammatory Activities and Multiple Susceptible Molecules and Pathways. *Front Genet.* 2020; 11: 968. doi: 10.3389/fgene.2020.00968

10. Liu S, Wu C, Zhang Y. Transcriptomics analyses of IL-1β-stimulated rat chondrocytes in temporomandibular joint condyles and effect of platelet-rich plasma. *Heliyon.* 2024; 10(4): e26739. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26739

11. Clemente TM, Augusto L, Angara RK, Gilk SD. Coxiella burnetii actively blocks IL-17-induced oxidative stress in macrophages. *bioRxiv [Preprint]*. 2023: 2023.03.15.532774. doi: 10.1101/2023.03.15.532774

12. Chen X, Ruiz-Velasco A, Zou Z, Hille SS, Ross C, Fonseka O, et al. PAK3 Exacerbates Cardiac Lipotoxicity via SREBP1c in Obesity Cardiomyopathy. *Diabetes.* 2024; 73(11): 1805-1820. doi: 10.2337/db24-0240

13. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12(12): 931-947. doi: 10.1038/nrd4002

14. Papadopoulou D, Mavrikaki V, Charalampous F, Tzaferis C, Samiotaki M, Papavasileiou KD, et al. Discovery of the First-in-Class Inhibitors of Hypoxia Up-Regulated Protein 1 (HYOU1) Suppressing Pathogenic Fibroblast Activation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2024; 63(14): e202319157. doi: 10.1002/anie.202319157

15. Liu DM, Yang D, Zhou CY, Wu JS, Zhang GL, Wang P, et al. Aloe-emodin induces hepatotoxicity by the inhibition of multidrug resistance protein 2. *Phytomedicine.* 2020; 68: 153148. doi: 10.1016/j.phymed.2019.153148

16. Dasgupta N, Lei X, Shi CH, Arnold R, Teneche MG, Miller KN, et al. Histone chaperone HIRA, promyelocytic leukemia protein, and p62/SQSTM1 coordinate to regulate inflammation during cell senescence. *Mol Cell.* 2024; 84(17): 3271-3287.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2024.08.006

17. Liu X, Zhang G, Liu L, Xiong G, Liu J, Wei W. USP2 Promotes the Proliferation and Inflammation of Fibroblast-Like Synovial Cells in Rheumatoid Arthritis Through Deubiquitination of TRAF2. *Biochem Genet.* 2024; 13. doi: 10.1007/s10528-024-10737-1

18. Lee TG, Woo SM, Seo SU, Kim S, Park JW, Chang YC, et al. Inhibition of USP2 Enhances TRAIL-Mediated Cancer Cell Death through Downregulation of Survivin. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(16): 12816. doi: 10.3390/ijms241612816

19. Zhang Z, Sun D, Tang H, Ren J, Yin S, Yang K. PER2 binding to HSP90 enhances immune response against oral squamous cell carcinoma by inhibiting IKK/NF-κB pathway and PD-L1 expression. *J Immunother Cancer.* 2023; 11(11): e007627. doi: 10.1136/jitc-2023-007627

20. Zhu L, Zhang S, Huan X, Mei Y, Yang H. Down-regulation of TRAF4 targeting RSK4 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer xenografts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 500(3): 810-816. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.164

21. Tang Y, Yang K, Liu Q, Ma Y, Zhu H, Tang K, et al. Preosteoclast plays a pathogenic role in syndesmophyte formation of ankylosing spondylitis through the secreted PDGFB – GRB2/ERK/RUNX2 pathway. *Arthritis Res Ther.* 2023; 25(1): 194. doi: 10.1186/s13075-023-03142-3

22. Delgobo M, Weiß E, Ashour D, Richter L, Popiolkowski L, Arampatzi P, et al. Myocardial Milieu Favors Local Differentiation of Regulatory T Cells. *Circ Res.* 2023; 132(5): 565-582. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.322183

23. Sun Y, Xu H, Gao W, Deng J, Song X, Li J, et al. S100a8/A9 proteins: critical regulators of inflammation in cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2024; 11: 1394137. doi: 10.3389/fcvm.2024.1394137

24. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Involvement of Oxidative Stress in Protective Cardiac Functions of Calprotectin. *Cells.* 2022; 11(7): 1226. doi: 10.3390/cells11071226

25. Dou Q, Turanov AA, Mariotti M, Hwang JY, Wang H, Lee SG, et al. Selenoprotein TXNRD3 supports male fertility via the redox regulation of spermatogenesis. *J Biol Chem*. 2022; 298(8): 102183. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102183

26. Hu K, Li K, Lv J, Feng J, Chen J, Wu H, et al. Suppression of the SLC7A11/glutathione axis causes synthetic lethality in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *J Clin Invest.* 2020; 130(4): 1752-1766. doi: 10.1172/JCI124049

27. Bally AP, Lu P, Tang Y, Austin JW, Scharer CD, Ahmed R, et al. NF-kappaB Regulates PD-1 Expression in Macrophages. *J Immunol.* 2015; 194(9): 4545–4554. doi: 10.4049/jimmunol.1402550

28. Zhao Y, Li Z, Chen Y, Li Y, Lu J. Suppression of P2X7R by Local Treatment Alleviates Acute Gouty Inflammation. *J Inflamm Res.* 2023; 16: 3581-3591. doi: 10.2147/JIR.S421548

29. Lapkina E, Zinchenko I, Kutcenko V, Bondar E, Kirichenko A, Yamskikh I, et al. MiR-204-5p overexpression

abrogates Dacarbazine-induced senescence in melanoma cells *in vivo*. *Noncoding RNA Res*. 2024; 10: 130-139. doi: 10.1016/j.ncrna.2024.09.009

30. Trousil S, Lee P, Edwards RJ, Maslen L, Lozan-Kuehne JP, Ramaswami R, et al. Altered cytochrome 2E1 and 3A P450-dependent drug metabolism in advanced ovarian cancer correlates to tumour-associated inflammation. *Br J Pharmacol.* 2019; 176(18): 3712-3722. doi: 10.1111/bph.14776

31. Cao C, Tian B, Geng X, Zhou H, Xu Z, Lai T, et al. IL-17-Mediated Inflammation Promotes Cigarette Smoke-Induced Genomic Instability. *Cells.* 2021; 10(5): 1173. doi: 10.3390/cells10051173

32. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis*. 2019; 10(3): 177. doi: 10.1038/s41419-019-1407-6

33. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(13): 4777. doi: 10.3390/ijms21134777

34. Deng Y, Adam V, Nepovimova E, Heger Z, Valko M, Wu Q, et al. N-terminal kinase signaling in cellular senescence. *Arch Toxicol.* 2023; 97(8): 2089-2109. doi: 10.1007/s00204-023-03540-1

35. Cowman SJ, Koh MY. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment. *Trends Cancer.* 2022; 8(1): 28-42. doi: 10.1016/j.trecan.2021.10.004

36. Mattei AL, Bailly N, Meissner A. DNA methylation: a historical perspective. *Trends Genet*. 2022; 38(7): 676-707. doi: 10.1016/j.tig.2022.03.010

Сведения об авторах

Лапкина Екатерина Зиядхановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; e-mail: e.z.lapkina@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7226-9565

Зинченко Иван Сергеевич – старший лаборант кафедры патологической физиологии имени профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; e-mail: Zinchenko.Ivan.003@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-7085-6304

Бондар Евгения Ивановна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории геномных исследований и биотехнологии Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук; старший преподаватель кафедры геномики и биоинформатики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; e-mail: bondar.zhenya.iv@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3762-6974

Сергеева Екатерина Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патологической физиологии им. профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; e-mail: e.yu.sergeeva@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2089-6022

Рукша Татьяна Геннадьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии им. профессора В.В. Иванова ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8142-4283

Information about the authors

Ekaterina Z. Lapkina – Cand. Sc. (Biol.), associate Professor Pathophysiology Department, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky; e-mail: e.z.lapkina@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7226-9565

Ivan S. Zinchenko – assistant of the Pathophysiology department, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky; e-mail: Zinchenko.Ivan.003@gmail.com, https://orcid.org/0000-0001-7085-6304

Evgeniya I. Bondar – Cand. Sc. (Biol.), senior researcher at the Laboratory of Genomic Research and Biotechnology of the Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; senior lecturer at the Department of genomics and bioinformatics of the Siberian Federal University; e-mail: bondar.zhenya.iv@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3762-6974

Ekaterina Yu. Sergeeva – Dr. Sc. (Med.), Professor, Professor of the Pathophysiology department, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky; e-mail: e.yu.sergeeva@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-2089-6022

Tatiana G. Ruksha – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Pathophysiology Department, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky; e-mail: tatyana_ruksha@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8142-4283