

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АРАНОЗЫ, ЦИСПЛАТИНА И ПАКЛИТАКСЕЛА В МОНОРЕЖИМЕ И В СОЧЕТАНИИ НА АКТИВНОСТЬ PD–L1 И PD–L2 В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ

А.А. Рудакова, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарёв, О.С. Бурова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Андреевна Рудакова RudakovaAn93@yandex.ru

Введение. В настоящее время для лечения рака применяются следующие подходы: хирургическое удаление опухоли, химиотерапия, таргетная терапия и иммунотерапия. Комбинирование препаратов различных классов позволяет добиться большего терапевтического эффекта по сравнению с их применением в монорежиме. Более того, могут наблюдаться и другие эффекты, в том числе изменение уровня экспрессии белков PD–L1 и PD–L2, важных мишеней чекпойнт-терапии.

Цель исследования — оценить влияние аранозы, цисплатина и паклитаксела в монорежиме или в комбинации на изменение уровня экспрессии мРНК и белков PD–L1 и PD–L2 в клеточных линиях меланомы и сопоставить результат со степенью дифференцировки клеток и наличием или отсутствием мутаций.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях меланомы человека, полученных из опухолевого материала больных. Уровень экспрессии генов PD–L1 и PD–L2 оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В реакции иммунофлуоресценции оценивали экспрессию белков PD–L1 и PD–L2. Данные анализировали методами корреляционного анализа и медианного теста.

Результаты. Уровень экспрессии гена PD–L2 прямо коррелировал со степенью дифференцировки клеток (коэффициент Пирсона 0,937, $p < 0,15$). Активность гена PD–L1 и белков PD–L1 и PD–L2 не связана со степенью дифференцировки, а также не зависит от наличия мутаций гена TP53. PD–L2 экспрессируется на меньшем уровне в клеточных линиях, имеющих мутации гена BRAF ($p = 0,0117$). Интересно, что мутации в гене TP53 наблюдаются при наличии мутаций BRAF (коэффициент Пирсона 1, $p < 0,15$). Воздействие аранозы привело к увеличению уровня экспрессии гена PD–L1 ($p = 0,23$). Инкубация с цисплатином в комбинации с паклитакселом также приводила к увеличению уровня экспрессии белка PD–L1 ($p = 0,037$). Цисплатин и паклитаксел в монорежиме не оказывали влияния на экспрессию белка PD–L1. Уровень экспрессии гена и белка PD–L2 снижался под действием любого препарата, но статистически незначимо ($p = 0,6$).

Выводы. Исследованные препараты практически не оказывают влияния на уровень экспрессии PD–L1 и PD–L2 как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Из этого следует, что сочетание анти-PD терапии и противоопухолевых препаратов, таких как паклитаксел и араноза, потенциально не снизит эффективность чекпойнт-терапии и может иметь большие перспективы применения в будущем при создании протоколов комбинированной терапии.

Ключевые слова: меланома, PD–L1, PD–L2, араноза, цисплатин, паклитаксел

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-71-80

THE EFFECTS OF ARANOSE, CISPLATIN OR PACLITAXEL IN MONOTHERAPY AND IN COMBINATION ON THE EXPRESSION OF PD–L1 AND PD–L2 IN MELANOMA CELLS

A.A. Rudakova, V.A. Misyurin, A.V. Ponomarev, O.S. Burova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova

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

Introduction. Currently, the following approaches are used for cancer treatment: surgical tumor removal, chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy. The combination of different drugs may have additional advantages due to cumulative effect. Moreover, some additional effects like changes in PD–L1 and PD–L2 expression levels may be observed.

Aim. The aim of this study was to determinate the influence of aranose, cisplatin or paclitaxel and their combination on the expression of mRNA level and proteins PD–L1 and PD–L2 in melanoma cell lines and to compare the results with the differentiation status and with the appearance of mutations in melanoma cells.

Materials and methods. Melanoma cell lines used in this study were derived from surgical species of patients with disseminated melanoma. The mRNA expression level of PD–L1 and PD–L2 genes was measured by RQ-PCR. The expression of PD–L1 and PD–L2 proteins was measured by flow cytometry. The Pearson's correlation and median test were used for statistical analysis.

Results. The expression level of PD–L2 gene was correlated with melanoma cell's differentiation status (Pearson's coefficient 0.937, $p < 0.15$). The expression levels of PD–L1 gene and PD–L1 and PD–L2 proteins were not correlated with differentiation status of melanoma cells as well as TP53 mutations. In case of BRAF mutations the expression of PD–L2 was low detectable ($p = 0.0117$).

It is worth noting that the TP53 mutations were associated with BRAF mutations (Pearson's coefficient 1, $p < 0.15$). The exposure of cells to aranose led to increased PD-L1 gene expression ($p = 0.23$). Incubation with cisplatin in combination with paclitaxel also resulted in an increase in PD-L1 protein expression ($p = 0.037$). Cisplatin or paclitaxel had no effect on the expression of PD-L1 protein. The expression level of PD-L2 gene and protein decreased under the action of any of these two drugs: these data are statistically ($p = 0.6$).

Conclusion. *The tested drugs had no effect on the expression of PD-L1 and PD-L2 both at the protein level and at the mRNA level. It follows that the combination of anti-PD therapy and anticancer drugs, such as paclitaxel and aranose, will not potentially reduce the effectiveness of checkpoint therapy, and may have great prospects for future use in the creation of combined therapy protocols.*

Key words: melanoma, PD-L1, PD-L2, aranose, cisplatin, paclitaxel

Введение

Меланома — агрессивная неоплазия, вызванная злокачественной трансформацией меланоцитов, пигментгенерирующих клеток кожи, которая является причиной 75 % всех смертей, связанных с раком кожи. Меланома фенотипически и молекулярно-неоднородное заболевание, выделяют кожные, увеальные, акральные и слизистые меланомы. Они имеют разные варианты клинических проявлений, лечения и прогноза, так как обладают различными мутационными профилями и различными факторами риска. Меланома кожи характеризуется наибольшим числом мутаций по сравнению с другими солидными опухолями [1, 2]. Идентифицированы онкогенные мутации *BRAF* (около 50 %), *NRAS* (около 15–20 %), *c-Kit* (около 2 %) и нуклеотид Guanine (GNAQ / GNA11) (около 50 % случаев увеальной меланомы) [3]. Идентификация этих молекулярных аномалий при меланоме имеет значение для развития таргетной терапии [4].

Мутация в гене *BRAF* — наиболее распространенное событие, встречающееся примерно в половине случаев меланомы. Самыми распространенными онкогенными мутациями *BRAF* в меланоме являются BRAFV600E и BRAFV600K, представляющие 80–90 и 10–20 % всех мутаций *BRAF* соответственно [5, 6]. Киназы BRAFV600E и BRAFV600K — конститутивно активные, поддерживают передачу сигнала по MAPK-каскаду и стимулируют рост клеток. Фенотипически BRAFV600E и BRAFV600K придают агрессивное поведение клеткам меланомы [7, 8], а их наличие у больного коррелирует с неблагоприятным прогнозом [6].

Идентификация мутаций *BRAF* в опухолях меланомы привела к разработке направленных на MAPK-каскад малых молекул — ингибиторов киназ, в частности ингибиторов *BRAF* и *MEK*. Блокируя сигнальный путь MAPK, эти агенты значительно улучшили выживаемость пациентов с мутацией BRAFV600, что привело к внедрению в клиническую практику вемурафениба в 2011 г., дабрафениба и траметиниба в 2013 г. в США [9–11]. По разным данным, соматические мутации гена *BRAF* выявляются в 40–88 % случаев при местно-распространенных и метастатических формах меланомы [12]. И хотя больные, не

имеющие мутации *BRAF*, не могут получать анти-BRAF-терапию, для них возможны другие способы лечения.

Еще один перспективный метод лечения злокачественных новообразований — иммунотерапия [13–15]. PD-1 (белок запрограммированной гибели клеток/programmed cell death-1) экспрессируется на поверхности активированных Т-лимфоцитов [16, 17]. Ассоциация PD-1 с лигандами приводит к инактивации Т-клеток. Известны 2 лиганда PD-1: PD-L1 и PD-L2 [18]. В физиологических условиях PD-L1 экспрессируется на иммунных клетках, включая дендритные клетки (DCs), а также на негемопоэтических клетках [19], а PD-L2 экспрессируется лишь на активированных макрофагах и дендритных клетках [20]. Взаимодействие рецептора с лигандом PD-L1 на опухолевых клетках и клетках опухолевого микроокружения приводит к иммуносупрессии и подавлению противоопухолевого иммунного ответа [21–24]. Поэтому блокирование либо иммунного контрольного белка PD-1, либо его лигандов PD-L1 и/или PD-L2 — это новые стратегии противоракового лечения, которые уже доказали свою эффективность [25]. Однако к блокаторам PD-1 в некоторых случаях развивается резистентность [26]. Долгосрочные ответы на анти-PD-1-терапию наблюдались у 30–35 % пациентов с метастатической меланомой [27].

Несмотря на эти достижения, использование представленных подходов, а также химиопрепаратов в качестве монотерапии имеет значительные ограничения. Возрастает интерес к использованию комбинаций препаратов, так как ожидается взаимное усиление их лекарственного эффекта [28].

Иммунотерапия эффективна при разных типах опухолей, и поэтому сочетание химиотерапии с ингибиторами PD-1 может, во-первых, уменьшить токсическую нагрузку на организм, во-вторых, усилить противоопухолевый ответ путем воздействия на опухоль иммунных клеток и, в-третьих, непосредственно воздействовать на стромальные клетки опухоли. Выбор химиотерапевтического средства и время для применения комбинаций будет иметь большое значение, поскольку многие цитотоксические химиопрепараты нацелены на быстрое деление клеток [29].

Лечение ингибиторами *BRAF* улучшает противоопухолевый иммунный ответ на меланому, возможно, путем увеличения перекрестного представления антигенов из мертвых опухолевых клеток [30, 31]. Развитие резистентности к ингибиторам *BRAF* сопровождается увеличением уровня экспрессии PD-L1 на клетках меланомы [32]. Исследования с использованием мышиной модели с мутацией BRAFV600E показали, что блокада PD-1 или PD-L1 в сочетании с ингибированием *BRAF* увеличивает активность опухолеинфильтрирующих лимфоцитов и опосредует более продолжительную выживаемость [33]. На основе данных наблюдений в настоящее время ведутся клинические испытания, в которых оцениваются комбинации блокаторов PD-1 с ингибиторами *BRAF*, такими как вемурафениб (NCT01656642) или дабрафениб (Tafinlar; GlaxoSmithKline) [34]. Но даже такие комбинации оказались неидеальными. По этой причине классические цитотоксические препараты остаются актуальными, так как их тоже можно сочетать и с анти-PD1-терапией, и друг с другом.

Цисплатин, цисплатина или цис-диамминдихлорплатина (II) является хорошо известным химиотерапевтическим лекарственным средством. Он используется для лечения многочисленных онкологических заболеваний человека, включая рак мочевого пузыря, головы и шеи, легких, яичников и яичек. Эффективен при различных видах рака, включая карциномы, опухоли зародышевых клеток, лимфомы и саркомы. Однако из-за развития резистентности к цисплатину и многочисленных нежелательных побочных эффектов, таких как почечная недостаточность, аллергические реакции, снижение иммунитета к инфекциям, желудочно-кишечные расстройства, кровоизлияние и потеря слуха, особенно у более молодых пациентов, другие платиновые лекарственные средства, такие как карбоплатин, оксалиплатин и проч., стали чаще применяться в противоопухолевой терапии [35].

Начальная чувствительность к препаратам платины — высокая, но у большинства больных в конечном счете происходит рецидив заболевания, резистентного к цисплатину. Следовательно, лекарственная устойчивость развивается у многих пациентов. Для преодоления резистентности цисплатин обычно используется в сочетании с некоторыми другими препаратами [36].

К достоинствам цисплатина, помимо его эффективности, относится то, что механизм его противоопухолевой активности отличается от токсичности других противоопухолевых препаратов [37]. В связи с этим комбинированная химиотерапия с цисплатином стала основой для лечения многих видов рака.

Паклитаксел занимает особое место среди эффективных противоопухолевых химиопрепаратов.

Он характеризуется высокой терапевтической активностью при лечении рака молочной железы, яичников, головы и шеи, а также успешно применяется в случае злокачественных новообразований, не поддающихся традиционной химиотерапии [38].

Паклитаксел относится к цитотоксическим агентам таксана и к числу наиболее часто назначаемых химиотерапевтических средств в онкологии. Паклитаксел является естественным экстрактом, полученным из коры тихоокеанского тисового дерева (*Taxus brevifolia*), который стал коммерчески доступным в 1992 г. Препарат препятствует сборке микротрубочек, способствует полимеризации тубулина в высокостабильные структуры, тем самым нарушает митоз и в конечном итоге приводит к гибели опухолевых клеток [39–42].

Частота положительных ответов во II фазе клинических испытаний таксанов варьирует от 3,3 до 17 %. Сочетания таксанов с платиновыми и другими химиопрепаратами продемонстрировали частоту ответа от 12 до 41 %, что свидетельствует о том, что они более эффективны в комбинированной химиотерапии. Таксаны, как в качестве отдельных агентов, так и в комбинации, могут быть вариантом лечения для некоторых пациентов с метастатической меланомой [43].

Еще одним химиопрепаратом, применяемым для лечения метастатической меланомы, является араноза, разработанная в НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [44–49]. Общая эффективность монотерапии аранозой при лечении диссеминированной меланомы кожи составила 20,6 % [50].

В настоящее время сочетания химиопрепаратов с анти-PD-L1 и PD-L2 интенсивно изучаются при опухолях разных локализаций и молекулярных подтипов. В связи с этим актуальным вопросом остается влияние различных сочетаний химиопрепаратов на уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2, мишеней для чекпойнт-терапии.

Материалы и методы

Клеточные линии

Исследования проводили на клеточных линиях меланомы человека mel Mtp, mel Z, mel Kor, mel Ibr, mel P, mel Is, mel Me, mel H, mel Hn, mel Bgf, mel Si, mel Rac, mel Gus, mel Gi, mel Ksen, mel Ch, mel Il, mel R, полученных из опухолевого материала больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [51]. Клеточные линии различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций генов *BRAF* и *TP53* [52–54]. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки эмбриона теленка, 2мМ L-глутамин (Sigma, США),

пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при +37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Культуры клеток пересевали через 3–4 дня.

МТТ-тест

В МТТ-тесте изучали цитотоксическое действие на клеточные линии противоопухолевых препаратов: араинозы, цисплатина и паклитаксела. Препараты добавляли как в монорежиме, так и в комбинации.

Клетки вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты по 7×10^3 клеток в 180 мкл ростовой среды на лунку. Через 24 ч в лунки с клетками добавляли по 20 мкл препаратов. Араинозу добавляли в концентрациях 125, 250 и 500 мкг/мл. Для цисплатина и паклитаксела было выбрано по 9 концентраций с 2-кратным шагом разведения: 0,39–100 мкг/мл и 1,171–300 мкг/мл.

Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч при +37 °С и 5 % CO₂. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (1 мг/мл, Sigma, Chemical Co, США) и оставляли еще на 4 ч при +37 °С при 5 % CO₂. По окончании инкубации планшеты центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в лунки по 150 мкл диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) для растворения кристаллов формазана, после чего планшеты встряхивали на шейкере для равномерного распределения окрашивания. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «Multiscan EX» (ThermoLabsystems, Германия) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = N_1 / N_2 \cdot 100 \%,$$

где N_0 – процент живых клеток; N_1 – средняя оптическая плотность в лунках, содержащих клетки и препарат; N_2 – средняя оптическая плотность в контрольных лунках, содержащих только клетки.

Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 моль NaCl, 1 моль Трис-НСl pH 8,0, 1 моль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл 0,9 % физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [55]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4 моль тиоционата гуанидина, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % N-лаурил-саркозината натрия и 0,1 моль меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (pH 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (pH 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до +4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропаноле проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при +37 °С, растворяли в 20 мкл деионизованной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг мРНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Transcriptase и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизованной водой.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 ммоль трис-НСl, 100 ммоль KCl, 4 ммоль MgCl₂, 1 ммоль каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 ммоль β-меркаптоэтанола) и Taq-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нмоль прямого и 250 нмоль обратного праймера и 140 нмоль флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *PD-L1* и *PD-L2*, доступных на интернет-ресурсе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

В каждом образце был исследован уровень экспрессии генов *PD-L1* и *PD-L2*. Уровень экспрессии

рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DTlite («ДНК-технология», Россия).

Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при +94 °C и 45 циклов денатурации в течение 10 с при +94 °C с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при +60 °C.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Нех. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [56]. В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Реакция иммунофлуоресценции

После 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами клетки снимали с культуральных флаконов раствором Версена и 2 раза отмывали в PBS. Разносили в пробирки по 50 мкл и добавляли по 20 мкл антител к PD-L1 (CD274FITC, 558065, BD Pharmingen™) и к PD-L2 (CD273APC, 557926, BD Pharmingen™). Инкубировали в течение 30 минут, после чего дважды отмывали в PBS. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII, с использованием программного обеспечения FACSDiva (Bekton Dikenson).

Анализ данных

Для статистического анализа данных использовались непараметрические критерии. Для определения связи между цитотоксичностью препаратов и наличием мутаций в генах *BRAF* и *TP53* или степенью дифференцировки клеток, между наличием мутаций в генах *BRAF* и *TP53* и уровнем экспрессии PD-L1 и PD-L2, а также для сравнения цитотоксической активности различных комбинаций препаратов и связи этих препаратов с уровнем экспрессии PD-L1 и PD-L2 на уровне белка и мРНК использовался критерий Манна–Уитни. Для изучения корреляции между уровнем экспрессии генов PD-L1 и PD-L2 и степенью дифференцировки клеток числялся коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты

Для определения эффективных концентраций исследуемых препаратов изучили их цитотоксическую активность на линиях клеток меланомы человека с помощью МТТ-теста, по результатам которого рассчитывали IC50 — концентрацию, при которой

детектировали ингибирование метаболической активности 50 % клеток (см. таблицу).

Определение чувствительности клеток меланомы человека к цитотоксическому действию препаратов показало, что при сопоставлении величины IC50 с наличием мутаций генов *BRAF* или *TP53* связь не выявлена ($p > 0,5$ во всех случаях). Высокодифференцированные линии несколько более чувствительны к препаратам, так как для достижения IC50 требовалась меньшая концентрация препаратов ($p = 0,154$). IC50 комбинации цисплатина с паклитакселом и паклитаксела в монорежиме не различаются ($p = 0,431$).

Определен уровень экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека (рис. 1). Активность белков PD-L1 и PD-L2 не связана со степенью дифференцировки, а также не зависит от наличия мутаций гена *TP53*. Наличие мутации *BRAF* в клеточных линиях меланомы человека связано с меньшим уровнем экспрессии PD-L2 ($p = 0,0117$). Инкубация цисплатина в комбинации с паклитакселом также увеличивает уровень экспрессии белка PD-L1 ($p = 0,037$). Цисплатин и паклитаксел в монорежиме не оказывают влияния на экспрессию белка PD-L1. Уровень экспрессии белка PD-L2 несколько снижается под действием любого препарата, но статистически незначимо ($p = 0,609$).

Также был определен уровень экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 (рис. 2). Уровень экспрессии PD-L2 прямо коррелировал со степенью дифференцировки клеток (коэффициент Пирсона 0,937, $p < 0,15$), а активность гена не связана со степенью дифференцировки. Наличие гена *TP53* не оказывает никакого влияния на экспрессию генов PD-L1 и PD-L2. Интересно, что мутации в гене *TP53* наблюдаются в случае мутаций гена *BRAF* (коэффициент Пирсона 1, $p < 0,15$). Араноза незначимо повышает уровень экспрессии мРНК PD-L1 в линиях меланомы ($p = 0,23$).

Заключение

Согласно полученным нами результатам мутации генов *BRAF* или *TP53* не оказывают влияния на чувствительность к препаратам, представленным в исследовании. Степень дифференцировки клеток также оказывает незначимое влияние. Из этого следует, что паклитаксел, цисплатин и аранозу можно применять независимо от наличия мутаций *BRAF* или *TP53*.

Комбинация цисплатина с паклитакселом по проявленной цитотоксичности может не обладать особыми преимуществами по сравнению с паклитакселом в монорежиме. Не удалось обнаружить каких-то признаков, при которых применение цисплатина с паклитакселом одновременно могло бы быть полезным в клинической практике, так как паклитаксел

Наличие мутаций в клеточных линиях меланомы и IC50 аранозы, цисплатина и паклитаксела, а также сочетания цисплатина и паклитаксела

Клеточные линии	Мутации BRAF	Мутации TP53	Араноза, IC50, мкг	Цисплатин, IC50, мкг	Паклитаксел, IC50, мкг	Сочетание цисплатина и паклитаксела, IC50, мкг
Mel BGF	Нет	—	2000	—	—	—
Mel Ch	Нет	Нет	1300	—	—	—
Mel Gus	Нет	Нет	2000	8,4	14,2	3,62
Mel H	Нет	—	1800	—	—	—
Mel Hn	V600E	P151S и S240F	1500	12,5	2,9	3,54
Mel Ibr	V600E	E171A	2000	6,6	10	3,82
Mel II	V600K	Нет	1900	8	9,7	1,42
Mel Is	V600E	Нет	1300	28	11	3,12
Mel Kor	Нет	Нет	500	—	—	—
Mel Ksen	V600E	—	2000	—	—	—
Mel Me	Нет	—	2000	11,4	8,6	2,00
Mel Mtp	Нет	—	2000	—	—	—
Mel P	V600E	—	1000	—	—	—
Mel R	V600E	—	1500	—	—	—
Mel Rac	Нет	Нет	1250	3,3	2,1	1,08
Mel Si	L597Q	—	1350	—	—	—
Mel Z	V600E	—	800	—	—	—
Mel Gi	V600E	Нет	1550	—	—	—

Примечание. «Нет» — отсутствует экспрессия; «—» нет данных.

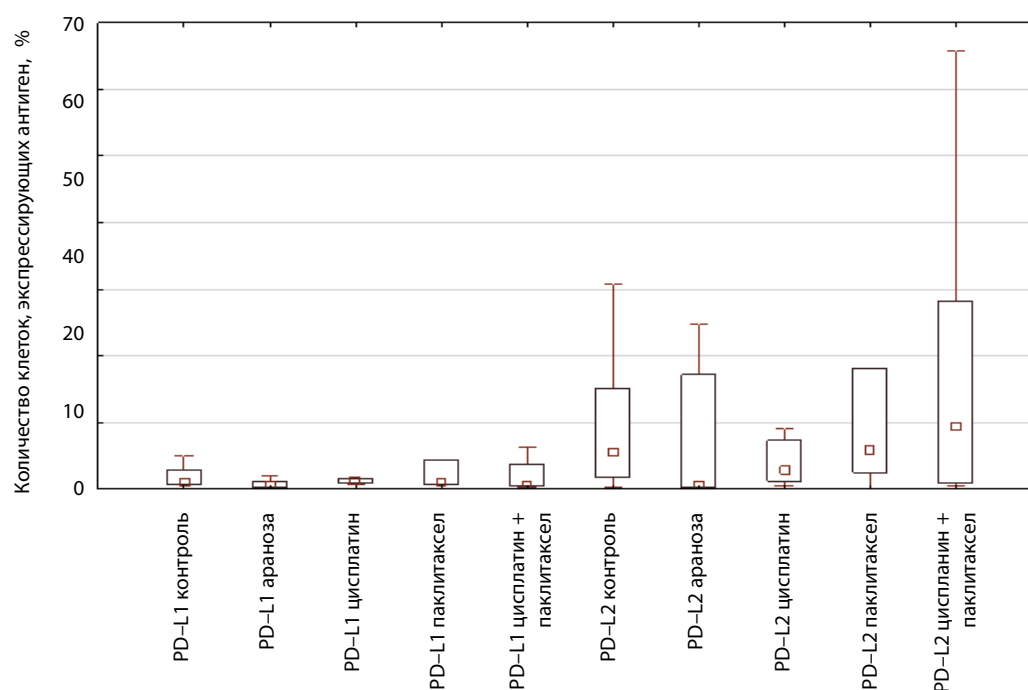


Рис. 1. Уровень экспрессии белков PD-L1 и PD-L2, подвергнутых воздействию различными химиопрепаратами

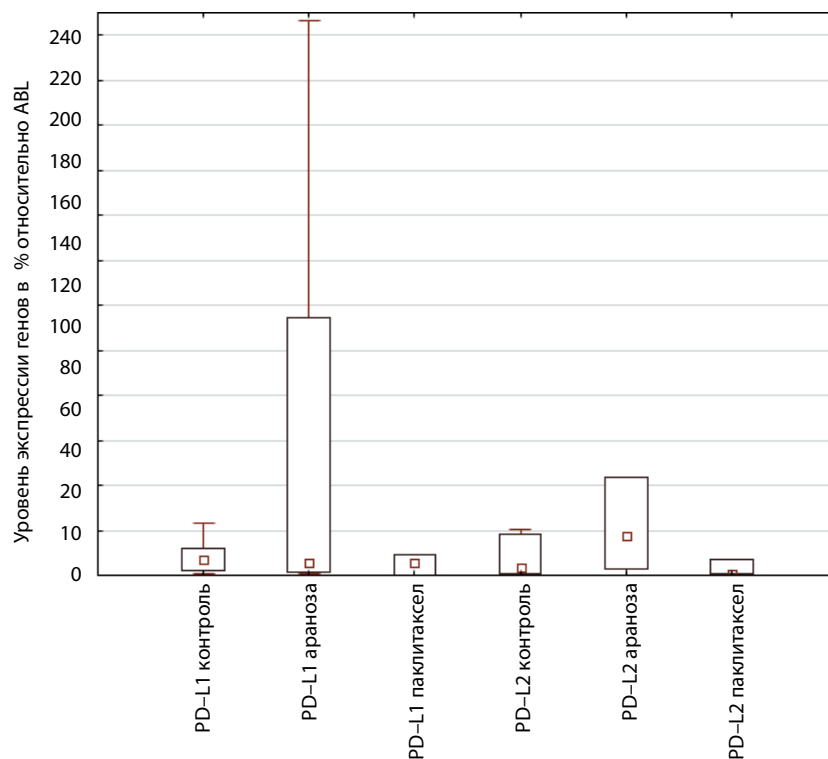


Рис. 2. Уровень экспрессии генов PD-L1 и PD-L2, подвергнутых воздействию различными химиопрепаратами

в монорежиме менее токсичен для организма больного в целом.

С опухолью взаимодействуют не только химиопрепараты, но и иммунная система. Мы показали, что наличие мутаций в гене *BRAF* несколько снижает экспрессию PD-L2. Это открывает новые возможности лечения, так как больные, имеющие мутации *BRAF*, могут получать таргетную терапию не только против киназы *BRAF*, но и анти-PD-терапию.

Исследованные препараты практически не оказывают влияния на уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2

как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Из этого следует, что сочетание анти-PD-терапии и противоопухолевых препаратов, таких как паклитаксел и араноза, потенциально не снизит эффективность чекпойнт-терапии, и может иметь большие перспективы.

Таким образом, при терапии больных сочетанием цисплатина и паклитаксела можно порекомендовать использование ингибиторов взаимодействия PD-1 и PD-Ls. Возможно, лучше не включать в терапию паклитаксел из-за опасности ухода опухоли от иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Berger M.F., Hodis E., Heffernan T.P. et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012;485(7399):502–6. PMID: 22622578. DOI: 10.1038/nature11071.
- Pleasant E.D., Cheetham R.K., Stephens P.J. et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010;463(7278):191–6. PMID: 20016485. DOI: 10.1038/nature08658.
- van den Hurk K., Niessen H.E., Veeck J. et al. Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(1):89–102. PMID: 22503822. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.03.011.
- Sosman J.A., Kim K.B., Schuschter L. et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;366(8):707–14. PMID: 22356324. DOI: 10.1056/NEJMoa1112302.
- Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S. et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118(16):4014–23. PMID: 22180178. DOI: 10.1002/cncr.26724.
- Long G.V., Menzies A.M., Nagrial A.M. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1239–46. PMID: 21343559. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.4327.
- Klein R.M., Aplin A.E. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res* 2009;69(6):2224–33. PMID: 19244113. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3201.

8. Arozarena I., Sanchez-Laorden B., Packer L. et al. Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* 2011;19(1):45–57. PMID: 21215707. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.10.029.
9. Zelboraf® (Vemurafenib) US prescribing information 2014. Genentech USA, Inc. South San Francisco, CA [Электронный ресурс]. URL: http://www.gene.com/download/pdf/zelboraf_prescribing.pdf.
10. Tafenlar® (Dabrafenib) US prescribing information 2014. GlaxoSmithKline. Research Triangle Park, NC [Электронный ресурс]. URL: http://us.gsk.com/products/assets/us_tafenlar.pdf.
11. Mekinist® (Trametinib) US prescribing information 2014. GlaxoSmithKline. Research Triangle Park, NC [Электронный ресурс]. URL: http://us.gsk.com/products/assets/us_mekinist.pdf.
12. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54. PMID: 12068308. DOI: 10.1038/nature00766.
13. Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей. *Онкопедиатрия* 2017;4(1):49–55. DOI: 10.15690/onco.v4i1.1684. [Klyuchagina Y.I., Sokolova Z.A., Baryshnikova M.A. Role of PD-1 Receptor and Its Ligands PD-L1 and PD-L2 in Cancer Immunotherapy. *Onkopediatriya = Oncopediatrics* 2017;4(1):49–55. (In Russ.)].
14. Чкадуа Г.З. Подходы к иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):118. [Chkadua G.Z. Approaches to Cancer Immunotherapy. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):118 (In Russ.)].
15. Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):6–14. (In Russ.)].
16. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11:3887–95. PMID: 1396582. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.
17. Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Рудакова А.А. и др. Изменение экспрессии PD–L1 и PD–L2 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии различных лекарственных форм аранозы и «пустых» липосом. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):74–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-74-81. [Ponomarev A.V., Misyurin V.A., Rudakova A.A. et al. The influence of aranoza drug formulations and “empty” liposomes on the expression of PD–L1 and PD–L2 in human melanoma cell lines. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(2):74–81. (In Russ.)].
18. Pedoeem A., Azoulay-Alfaguter I., Strazza M. et al. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol* 2014;153(1):145–52. PMID: 24780173. DOI: 10.1016/j.clim.2014.04.010.
19. Francisco L.M., Sage P.T., Sharpe A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010;236:219–42. PMID: 20636820. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
20. Ishida M., Iwai Y., Tanaka Y. et al. Differential expression of PD–L1 and PD–L2, ligands for an inhibitory receptor PD–1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 2002;84(1):57–62. PMID: 2161284. DOI: 10.1016/s0165-2478(02)00142-6.
21. Shin D.S., Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what’s here, what’s next? *Curr Opin Immunol* 2015;33:23–35. PMID: 25621841. DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.006.
22. Рудакова А.А., Пономарев А.В., Бурова О.С. и др. Изменение уровня экспрессии лигандов белка PD1 в клетках линий меланомы человека после воздействия субстанции и липосомальной лекарственной форм аранозы *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(1):68. [Rudakova A.A., Ponomarev A.V., Burova O.S. et al. Change of PD1 ligands expression level after Aranose substance and liposomal drug formulation in melanoma cell lines. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(1):68. (In Russ.)].
23. Рудакова А.А., Мисюрин В.А., Пономарев А.В. и др. Возможность моделирования активности маркеров PD–L1 и PD–L2 на поверхности клеток меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(специальный выпуск): 64. [Rudakova A.A., Misyurin V.A., Ponomarev A.V. et al. Modulation of PD–L1 and PD–L2 activity on melanoma cells. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue): 64. (In Russ.)].
24. Intlekofer A.M., Thompson C.B. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013;94(1):25–39. PMID: 23625198. DOI: 10.1189/jlb.1212621.
25. Iwai Y., Terawaki S., Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* 2005;17(2):133–44. PMID: 15611321. DOI: 10.1093/intimm/dxh194.
26. Жуликов Я.А., Фетисов Т.И., Самойленко И.В., Демидов Л.В. Механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(1):34–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-34-46. [Zhulikov Ya.A., Fetisov T.I., Samoylenko I.V., Demidov L.V. Mechanisms of resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic cutaneous melanoma *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(1):34–46. (In Russ.)].
27. Topalian S.L., Sznol M., McDermott D. F. et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014;32:1020–30. PMID: 24590637. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.0105.
28. Wargo J.A., Reuben A., Cooper Z.A. et al. Immune effects of chemotherapy, radiation, and targeted therapy and opportunities for combination with immunotherapy. *Semin Oncol* 2015;42(4):601–16. PMID: 26320064. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.007.
29. Postow M.A., Chasalow S.D., Yuan J. et al. Pharmacodynamic effect of ipilimumab on absolute lymphocyte count (ALC) and association with overall survival in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31(15):abstr 9052.
30. Donia M., Fagone P., Nicoletti F. et al. BRAF inhibition improves tumor recognition by the immune system: potential implications for combinatorial therapies against melanoma involving adoptive T-cell transfer. *Oncoimmunology* 2012;1:1476–83. PMID: 23264894. DOI: 10.4161/onci.21940.

31. Frederick D.T., Piris A., Cogdill A.P. et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor micro-environment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:1225–31. PMID: 23307859. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1630.
32. Jiang X., Zhou J., Giobbie-Hurder A. et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD–L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19:598–609. PMID: 23095323. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2731.
33. Cooper Z.A., Juneja V.R., Sage P.T. et al. Response to BRAF inhibition in melanoma is enhanced when combined with immune checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* 2014;2:643–54. PMID: 24903021. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0215.
34. Ribas A., Hodi F.S., Callahan M. et al. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med* 2013;368(14):1365–6. PMID: 23550685. DOI: 10.1056/NEJMc1302338.
35. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Europ J Pharm* 2014;740:364–78. PMID: 25058905. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025P.
36. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev* 2002;2:48–58. PMID: 11902585. DOI: 10.1038/nrc706.
37. O'Dwyer P.J., Stevenson J.P., Johnson S.W. Clinical Pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* 2000;59:19–27. PMID: 10864227. DOI: 10.2165/00003495-200059004-00003.
38. Мартынова М.А., Бушмакина И.М., Шуканова Н.А., Молчан М.М. Влияние нанолипосомальной формы паклитаксела на злокачественные опухоли женских репродуктивных органов. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(специальный выпуск):44. [Martynova M.A., Bushmakina I.M., Shukanova N.A., Molchan M.M. Effect of nanoliposomal Paclitaxel on tumors of female reproductive system. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue):44. (In Russ.)].
39. Rowinsky E.K., Donehower R.C. Paclitaxel(taxol). *N Engl J Med* 1995;332:1004–14. PMID: 7885406. DOI: 10.1056/NEJM199504133321507.
40. Cortes J.E., Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol* 1995;13(10):2643–55. PMID: 7595719. DOI: 10.1200/JCO.1995.13.10.2643.
41. Gelmon K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet* 1994;344:1267–72. PMID: 7967989. DOI: 10.1016/s0140-6736(94)90754-4.
42. Von Hoff D.D., Ervin T., Arena F.P. et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013;369:1691–703. PMID: 24131140. DOI: 10.1056/NEJMoa1304369.
43. Gogas H., Bafaloukos D., Bedikian A.Y. The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2004;14:415–20. PMID: 15457099. DOI: 10.1097/00008390-200410000-00013.
44. Шпрах З.С., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В. Валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(специальный выпуск):84. [Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartseva I.V. Validation of the method of quantitative determination of Aranose in a dosage form. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue): 84. (In Russ.)].
45. Шпрах З.С., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В. Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):57–62. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62. [Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartseva I.V. Development and validation of aranosa assay in the dosage form. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):57–62. (In Russ.)].
46. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Активация инициаторных каспаз-8 и -9 под влиянием лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):7. [Afanasyeva D.A., Baryshnikova M.A., Burova O.S. et al. Activation of initiator caspase-8 and -9 by aranose drug formulations. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):7. (In Russ.)].
47. Полозкова С.А., Горбунова В.А., Орел Н.Ф. Эффективность и токсичность комбинации аранозы и доксорубицином при метастатических нейроэндокринных неоплазиях. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):88. [Polozkova S.A., Gorbunova V.A., Orel N.F. Effect and toxicity of Aranose and Doxorubicin combination on metastatic neuroendocrine tumors. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):88. (In Russ.)].
48. Полозкова С.А., Горбунова В.А., Делекторская В.В. и др. Факторы прогноза эффективности терапии нейроэндокринных новообразований режимами на основе Аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(1):38–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-38-46. [Polozkova S.A., Gorbunova V.A., Delektorskaya V.V. et al. Prognostic factors of the efficacy of aranosa-based therapy in neuroendocrine neoplasms. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(1):38–46. (In Russ.)].
49. Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Рудакова А.А. и др. Изменение экспрессии мРНК MDM2 и NFkB1 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии 2 лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):52–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-52-58. [Ponomarev A.V., Misyurin V.A., Rudakova A.A. et al. The influence of drug formulations on the expression of MDM2 and NFkB1 mRNA in the melanoma cell lines Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(3):52–8. (In Russ.)].
50. Харкевич Г.Ю., Егоров Г.Н., Манзюк Л.В. и др. Отечественные нитрозопроизводные в лечении меланомы кожи. *Российский биотерапевтический журнал* 2003;2(1):49–53. [Kharkevich G. Yu., Egorov G.N., Manzyuk L.V. et al. Russian nitrosoarenes in skin melanoma therapy. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2003;2(1):49–53. (In Russ.)].
51. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы — основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;76:37–40. [Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu., et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. *Bulletin of RAMS = Annals of the Russian academy of medical sciences* 2005;73:37–40. (In Russ.)].
52. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;37(1):29–39. [Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Burova O.S. Expression of Cancer Testis Antigens in Human Melanoma. *Sibirskiy*

- oncologicheskii journal = Siberian journal of Oncology 2010;37(1):29–39. (In Russ.)].
53. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена B-RAF на способность клеток меланомы к аутофагии. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2013;3:68–72. [Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A. et al. Effect of Activating V600 mutations of the B-RAF gene on the ability of melanoma cells to autophagy. Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Sarkomas of Bones, Soft Tissues and Skin Tumors 2013;(3):68–72. (In Russ.)].
 54. Пономарев А.В., Солодовник А.А., Мкртчян А.С. и др. Связь делеций и точечных мутаций гена p53 с резистентностью клеточных линий метастатической меланомы кожи к арано-зе. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):64–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-64-69. [Ponomarev A.V., Solodovnik A.A., Mkrtchyan A.S. et al. Relationship between deletion and point mutations of p53 and drug resistance to aranoza in human melanoma cell lines. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):64–9. (In Russ.)].
 55. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;1(2):581–5. PMID: 2440339. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
 56. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. Methods Mol Biol 2013;999:1–23. PMID: 23666687. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_1.

ORCID авторов/ ORCID of authors

А.А. Рудакова/ A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>
 В.А. Мисюрин/ V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
 А.В. Пономарев/ A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>
 О.С. Бурова/ O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>
 А.В. Мисюрин/ A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>
 М.А. Барышникова/ M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

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