

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-1-10-18>

Профиль экспрессии гена и белка GAGE у больных онкологическими заболеваниями

А.А. Рудакова, А.Д. Ширин, Н.В. Голубцова, М.В. Пинюгина, В.А. Мисюрин

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Андреевна Рудакова rudakovaan93@yandex.ru

Раково-тестикулярные антигены (РТА) – антигены, экспрессируемые клетками опухолей различных гистологических типов, но практически отсутствующие в клетках нормальных тканей, за исключением половых клеток. К РТА относят более 100 белков, большинство из которых объединены в большие семейства. В настоящее время использование РТА в целях иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний было протестировано во многих исследованиях, и для многих случаев достигнуто увеличение времени выживаемости. Поэтому они могут являться перспективными мишенями для создания противоопухолевых препаратов, таргетной терапии опухолей и в качестве диагностических биомаркеров.

Целью настоящего обзора стало изучение семейства антигенов GAGE – одной из групп РТА, распознающихся Т-клетками. Белки этого семейства, экспрессируясь в клетках опухоли, стимулируют развитие гуморального и клеточного иммунного ответа против них. Из этого следует, что они вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к мишеням для иммунотерапии опухолей.

В обзоре представлены сведения о структуре и последовательности генов, кодирующих белки семейства GAGE. Подробно рассмотрены вопросы о роли GAGE в апоптозе и приведены результаты исследований, доказывающие, что GAGE-7С делает клетки устойчивыми к апоптозу, опосредованному интерфероном γ или Fas. Рассмотрены результаты клинических исследований экспрессии генов и белков группы GAGE при различных видах опухолевых заболеваний и приведены примеры выявленной корреляции между экспрессией GAGE и плохим прогнозом при некоторых видах рака.

Таким образом, белки группы GAGE при детальном исследовании могут стать возможным диагностическим и прогностическим маркером раковых заболеваний и в дальнейшем использоваться для оценки злокачественности и мониторинга опухолей для подбора тактики лечения.

Ключевые слова: GAGE, раково-тестикулярные антигены, экспрессия генов и белков

Для цитирования: Рудакова А.А., Ширин А.Д., Голубцова Н.В. и др. Профиль экспрессии гена и белка GAGE у больных онкологическими заболеваниями. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):10–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-10-18

GAGE gene and protein expression profile in cancer patients

Anna A. Rudakova, Anton D. Shirin, Natalia V. Golubtsova, Marina V. Pinyugina, Vsevolod A. Misyurin

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

Contacts: Anna Andreevna Rudakova rudakovaan93@yandex.ru

Cancer-testis antigens (CTA) are antigens expressed by tumor cells of various histological types, but practically absent in cells of normal tissues, with the exception of germ cells. CTA includes more than 100 proteins, most of which are grouped into large families. Currently, the use of CTA for immunotherapy in the treatment of oncological diseases has been tested in many studies, and an increase in survival time has been achieved for many cases. Therefore, they can be promising targets for the creation of antitumor drugs, targeted therapy of tumors and as diagnostic biomarkers.

The purpose of this review was to study the GAGE family of antigens, one of the CTA groups recognized by T cells. Proteins of this family, expressed in tumor cells, stimulate the development of a humoral and cellular immune response against them. It follows from this that they fully meet the requirements for targets for tumor immunotherapy.

The review provides information about the structure and sequence of genes encoding proteins of the GAGE family. The question of the role of GAGE in apoptosis is considered in detail and the results of studies proving that GAGE-7C makes cells resistant to apoptosis mediated by interferon γ or Fas are presented. The results of clinical studies of the expression of GAGE group genes and proteins in various types of tumor diseases are considered and examples of the reported correlation between GAGE expression and poor prognosis in some types of cancer are given. Thus, the proteins of the GAGE group, with a detailed study, can become a possible diagnostic and prognostic marker of cancer diseases, and in the future be used to assess malignancy and monitor tumors for the selection of treatment tactics.

Keywords: GAGE, cancer-testis antigens, gene and protein expression

For citation: Rudakova A.A., Shirin A.D., Golubtsova N.V. et al. GAGE gene and protein expression profile in cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(1):10–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-10-18

Раково-тестикулярные антигены в качестве мишени для иммунотерапии

Один из основных механизмов, опосредующих эффективность иммунотерапии, заключается в успешности привлечения Т-клеток к клеткам опухоли. Для проведения подобной реакции опухоль должна иметь антигены, отличающие ее от нормальных клеток. Подобные антигены известны как опухолеассоциированные антигены, частным случаем которых являются раково-тестикулярные антигены (РТА).

Первоначально РТА описали на основании тканевой локализации их паттерна экспрессии. В настоящее время к РТА относят более 100 белков, большинство из которых объединены в большие семейства, и кодирующие их гены находятся на хромосоме X. Гены собраны в кластеры, претерпевшие быструю эволюцию в основном из-за того, что они постоянно подвергались положительному отбору [1]. Остальные, не-X-хромосомные антигены, находятся в аутосомах, зачастую в единственной копии. РТА являются потенциальными молекулами для разработки методов опухолиспецифической иммунотерапии, направленной против них, поскольку Т-клетки успешно их распознают.

Раково-тестикулярные антигены экспрессируются во многих гистологических вариантах опухолей и при этом не встречаются в здоровых тканях, за исключением половых клеток, которые являются иммунопривилегированными из-за отсутствия или очень низкого уровня экспрессии молекул системы HLA [2–5]. Кроме того, против некоторых РТА естественным образом развивается клеточный и гуморальный иммунный ответ, что указывает на возможность создания вакцины против них в целях развития новых способов иммунотерапии [6–15]. Использование РТА в целях иммунотерапии при лечении онкологических заболеваний было протестировано во многих исследованиях, и для многих случаев достигнуто увеличение времени выживаемости [16, 17]. Таким образом, РТА являются перспективными мишенями как для создания таргетных противоопухо-

левых препаратов, так и в качестве диагностических биомаркеров.

Целью настоящего обзора стало изучение семейства антигенов GAGE — одной из групп РТА, которые экспрессируются в клетках опухоли и стимулируют развитие гуморального и клеточного иммунного ответа против них. При работе над данным обзором был проведен поиск литературы по ключевым словам «GAGE семейство белков», «GAGE опухоли», «GAGE иммунотерапия», «GAGE1», «GAGE immunotherapy», «GAGE cancer-testis protein» и «GAGE cancer» в поисковой системе Google и базе данных PubMed. Охвачен период с 1997 по 2022 г. Найдено и проанализировано 64 источника литературы, часть из которых не включена в настоящий обзор ввиду недостаточно глубокого рассмотрения особенностей белков группы GAGE либо отсутствия новых данных.

Гены группы GAGE

Одной из групп РТА, распознающихся Т-клетками, является семейство антигенов GAGE. Семейство было первоначально идентифицировано по реакции иммунного распознавания аутологичными цитотоксическими Т-лимфоцитами антигенов, представленных молекулами HLA-Cw6 и HLA-A29 на поверхности клеток меланомы человека [18, 19].

Семейство РТА GAGE включает небольшие белки, имеющие отрицательный заряд поверхности. Для всех этих белков предсказано высокое сходство их аминокислотных последовательностей. Кодируемые белки участвуют в развитии половых клеток. Экспрессируясь в клетках опухоли, белки GAGE стимулируют развитие гуморального и клеточного иммунного ответа против них. Из этого следует, что они вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к мишеням для иммунотерапии опухолей.

Последовательности генов, кодирующие белки семейства GAGE, расположены в равном числе tandemных повторов на хромосоме X (область p11.2–p11.4). В этом локусе обнаружено по меньшей мере

16 гомологичных друг другу генов. Высокое сходство последовательностей генов семейства *GAGE*, а также их равномерное распределение в локусе позволяют предположить, что это семейство возникло в результате дупликации предкового гена *GAGE*, причем это произошло относительно недавно в истории развития приматов. Это подтверждается тем, что не удалось найти аналоги *GAGE* в геноме хомяка или мыши. Поиск с использованием ресурса BLAST позволяет найти это семейство только у человека и шимпанзе. Отсюда следует, что только приматы имеют в своем геноме информацию о генах семейства *GAGE* [20].

Отдельные представители данного семейства получили название и объединены в группы в соответствии со следующими вариациями: 109_111insTAT, 112T>C и 136C>G, которые приводят к различиям в полипептидных последовательностях Y9del, W11R и Q19E и могут быть важны для функции белка. Эта аннотация разделяет гены на следующие группы: *GAGE1* (повтор 1) (без вставки L1, без 109_111insTAT, 112C, 136G), *GAGE2A–E* (повторы 2, 9, 10, 12, 13) (без 109_111insTAT, 112C, 136G), *GAGE10* (повтор 16) (нет 109_111insTAT, 112T, 136G), *GAGE12C–J* (повторы 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 и 15) (109_111insTAT, 112T, 136C) и *GAGE13* (повтор 14) (109_111insTAT, 112C, 136G). Система классифицирует участников по основным структурным группам и позволяет аннотировать новых членов по мере их открытия. Вероятно, что 2 гена, *GAGE13* и *GAGE10*, могли произойти путем дупликации генов *GAGE2* и *GAGE12*, в то время как *GAGE1*, единственный ген, в котором отсутствует вставка L1, скорее всего, является общим предком всей группы генов. Три из новых генов *GAGE* (*GAGE10*, *GAGE12J* и *GAGE13*) кодируют варианты ранее идентифицированных антигенных пептидов HLA-Cw6 и HLA-A29 и могут быть использованы для разработки вакцины [20].

Функции белков группы GAGE

Функции белков *GAGE* в целом остаются неустановленными, но известно, что они проявляются в форме устойчивости клеток к апоптозу [21]. В исследованиях ученых из Иллинойского университета в Чикаго изучалась роль *GAGE-7C* в двух аспектах онкогенеза, а именно устойчивости к апоптозу и проводимой противоопухолевой терапии [21]. Они исследовали роль *GAGE* в апоптозе, поскольку хорошо известно, что апоптоз играет важную роль в прогрессировании при некоторых типах опухолей [22]. Кроме того, повышенная экспрессия антиапоптотических генов, таких как *Bcl-2*, сурвивин и *Hsp 70*, связана с онкогенностью [23]. Как было установлено, *GAGE-7C* делает клетки устойчивыми к апоптозу, опосредованному интерфероном γ (IFN- γ) или Fas. Кроме того, показано, что *GAGE* делает клетки устой-

чивыми к таксолу и γ -облучению. В целом наблюдаемая экспрессия *GAGE-7C* в широком спектре опухолей человека по меньшей мере частично обусловлена его антиапоптотической активностью, и устойчивость к различным лекарственным воздействиям может объяснить выявленную корреляцию между экспрессией *GAGE* и плохим прогнозом при некоторых видах рака.

Для определения роли *GAGE* в апоптозе, индуцированном IFN- γ , были использованы 2 пула трансфицированных клеток *GAGE-7C*, а также контрольных трансфицированных клеток. Все эти клетки обрабатывали цитокином в течение 2 нед. Для оценки выживаемости клеток проводилось определение способности образования ими колоний [21]. В то время как контрольные трансфицированные клетки погибли в присутствии IFN- γ , *GAGE-7C*-трансфицированные клетки пролиферировали и образовывали видимые колонии. Таким образом, *GAGE-7C* делает клетки HeLa устойчивыми к IFN- γ -индуцированному апоптозу.

Может ли *GAGE-7C* защищать клетки от апоптоза, опосредованного активацией белка Fas, значимого проапоптотического рецептора? Два пула трансфицированных *GAGE-7C* клеток обрабатывали агонистическим анти-Fas-антителом. Апоптоз определяли путем окрашивания DAPI и подсчета фракции клеток, содержащих конденсированные и/или фрагментированные хромосомы. После 90 ч обработки 99 % контрольных трансфицированных клеток были в стадии апоптоза, в то время как трансфицированные *GAGE-7C* клетки были значительно более устойчивыми к Fas-индуцированному уничтожению, в результате чего наблюдалось только 41,5 и 42,3 % апоптотических клеток. Таким образом, антиапоптотическая активность *GAGE* проявляется не только при воздействии IFN- γ , но также посредством блокирования сигнального пути Fas.

Устойчивость к Fas-индуцированному апоптозу поставила перед исследователями интересный вопрос: устойчивы ли клетки к апоптозу, но при этом замедляют рост, или же они устойчивы к апоптотическому стимулу и могут размножаться после его удаления? Чтобы различить 2 возможности, 2 пула клеток *GAGE-7C* и 2 пула контрольных клеток обрабатывали антителом против Fas. В тот момент, когда каждая из контрольных популяций находилась в стадии апоптоза на 95 %, а каждая из популяций *GAGE-7C* была апоптотической только на 34 %, выжившие клетки *GAGE-7C* промывали, трипсинизировали, подсчитывали, пересеивали и выращивали при отсутствии анти-Fas антитела в течение 5 дней. Необработанные клетки *GAGE-7C* высевали с одинаковой плотностью. Клетки, трансфицированные *GAGE-7C*, которые выжили после обработки антителом против

Fas, демонстрировали сходное количество митозов по сравнению с клетками, которые не обрабатывали антителом против Fas. Таким образом, клетки GAGE-7C, которые выживают после апоптотического стимула, не склонны к гибели и способны к устойчивой пролиферации.

Данные эксперименты показали, что GAGE-7C делает клетки устойчивыми к апоптозу, вызванному 2 различными рецепторами клеточной поверхности, — рецепторами IFN- γ и Fas. Поскольку в настоящее время характеристика пути IFN- γ -киллинга является неполной, было сделано предположение, что антиапоптотическая активность GAGE проявляется «ниже по течению» от точки схождения 2 сигнальных путей. Эта активность не является уникальной для GAGE-7C, поскольку GAGE-7/7B также придает устойчивость к апоптозу, вызванному Fas. В будущем предстоит определить, является ли это свойство общим для всех членов семьи GAGE [21].

Z.M. Cilensek и соавт. задались вопросом, влияет ли GAGE-7C на устойчивость клеток к химиотерапии, проверив чувствительность трансфицированных GAGE-7C клеток к таксолу (паклитакселу) — цитотоксическому агенту, стабилизирующему микротрубочки. Клетки обрабатывали 5 нг/мл (5,8 нМ) или 10 нг/мл (11,7 нМ) таксола. После 30 ч обработки определяли способность клеток к пролиферации методом анализа образования колоний. Как при воздействии 5 нг/мл, так и при воздействии 10 нг/мл таксола контрольные трансфицированные клетки были убиты достаточно эффективно, в то время как трансфицированные GAGE-7C клетки образовывали видимые колонии. Микроскопическое исследование клеток, обработанных 5 нг/мл таксола, выявило большие, активно пролиферирующие колонии в трансфектантах GAGE-7C. При этом практически не обнаруживались клетки с aberrантной морфологией [21].

Чтобы исследовать роль GAGE-7C в ответе на ионизирующее излучение, клетки, трансфицированные GAGE-7C, обрабатывали различными дозами γ -облучения, реплицировали при низкой плотности, и колонии подсчитывали через 8 дней. Трансфицированные GAGE клетки демонстрировали повышенную радиационную выживаемость, обнаруживаемую при дозах 4 Гр и выше, достигая 4-кратной разницы по сравнению с контрольными клетками при 10 Гр. Следовательно, GAGE-7C делает клетки устойчивыми к γ -облучению, что подтверждается анализом образования колоний.

Активность GAGE-7C может способствовать прогрессии опухоли, позволяя опухолевым клеткам избегать апоптоза *in vivo*, включая опосредованное Т-клетками уничтожение через Fas-рецептор. Эта гипотеза подтверждается выводами о том, что выжив-

шие клетки GAGE-7C активно пролиферируют и демонстрируют повышенную долговременную выживаемость после лечения IFN- γ , γ -облучением или таксолом. Поскольку клетки GAGE растут со скоростью, неотличимой от скорости роста контрольных клеток, был сделан вывод, что устойчивость к 2 различным противораковым агентам, а именно γ -излучению и таксолу, не является результатом стимулирующей рост активности GAGE-7C. Полученные данные указывают на то, что устойчивость к радиации или таксолу можно отнести только отчасти к неспособности опухолевых клеток подвергаться апоптозу в зависимости от режима лечения, статуса p53 и происхождения опухоли [24, 25]. Поэтому пока не ясно, связана ли устойчивость к γ -облучению и таксолу, обусловленная GAGE-7C, с наблюдаемой устойчивостью к апоптозу, опосредованному рецептором, или же GAGE-7C играет роль в клетках различного гистологического происхождения.

В целом полученные результаты определяют функциональную связь между GAGE-7C и 2 аспектами прогрессирования опухоли человека: устойчивостью к Fas-индуцированному апоптозу и устойчивостью к химио- и радиотерапевтическим агентам. Более того, устойчивость к клинически значимым агентам может объяснить корреляцию между экспрессией GAGE и плохим прогнозом [12].

Таким образом, GAGE является привлекательной мишенью для лечения рака. Его инактивация у людей едва ли будет иметь пагубные последствия, в то время как он может повышать чувствительность опухолей к таксолу и γ -облучению и восстанавливать клеточный ответ на апоптотические стимулы. Дальнейшее выяснение молекулярного механизма, лежащего в основе антиапоптотической функции белков GAGE, ускорит разработку специфических противораковых препаратов.

Причины экспрессии генов группы GAGE

Причины экспрессии данных генов в опухоли изучены относительно мало. Есть только отрывочные сведения о том, что при мезотелиоме экспрессия GAGE увеличивалась после использования азациитидина.

В исследовании J.A. Tuxhorn и соавт. [26] показана прямая зависимость между активностью GAGEC1 и воздействием трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) в первичных стромальных и эпителиальных клетках предстательной железы.

Для исследования опосредованной TGF- β 1 индукции GAGEC1 первичные эпителиальные клетки предстательной железы (PrEC), первичные стромальные фибробласты предстательной железы (PrSC) и первичные фибробласты крайней плоти (PFF) стимулировали 1 нг/мл TGF- β 1 в течение 24 ч. Все типы

клеток подверглись видимым морфологическим изменениям при стимуляции TGF- β 1, став увеличенными, уплощенными и менее преломляющими свет по сравнению с предшествующими результатами, полученными для трансдифференцированных PrSCs и PrECs [26].

При помощи гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) выявили значительную индукцию GAGEC1 в PrSC и PrEC по сравнению с контрольными клетками, обработанными bFGF. Хотя морфология PFF указывала на то, что трансдифференцировка происходила при обработке TGF- β 1, не было заметной индукции GAGEC1, несмотря на идентичные условия *ex vivo*, указывающие на то, что индукция GAGEC1 в PrECs и PrSCs является клеточно-специфическим ответом на TGF- β 1.

Учитывая, что уровень TGF- β 1 увеличивается при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и раке поджелудочной железы, опосредованная TGF- β 1 индукция экспрессии GAGEC1 в первичных опухолях при данных заболеваниях предполагает возможный механизм, который может частично отвечать за активацию экспрессии GAGEC1. Кроме того, ядерно-цитоплазматическая локализация белка GAGEC1-E сходна с таковой у многих белков GAGE [27], что предполагает регуляцию экспрессии этих белков неким общим механизмом.

Результаты свидетельствуют о том, что увеличение уровня TGF- β 1, связанное с заболеванием, может объяснить увеличение экспрессии GAGEC1 при доброкачественной гиперплазии предстательной железы и раке предстательной железы.

Экспрессия генов и белков группы GAGE при различных видах опухолевых заболеваний

Транскрипты гена *GAGE* были обнаружены при многих видах рака, чаще всего при злокачественных меланомах (24–42 %) [28], раке легкого (19–54 %) [28], карциноме щитовидной железы (30 %) [29], раке молочной железы (26 %) [30], гепатоцеллюлярном раке (38 %) [31] и раке яичников (30 %) [32]. Иммуногистохимические исследования также выявили активность GAGE при нескольких видах рака, включая злокачественную меланому (17 %) и рак легкого (16 %), молочной железы (12 %) и щитовидной железы (10 %), но, как правило, с более низкой частотой, чем при исследовании методом ПЦР [33].

Экспрессия GAGE коррелирует с поздними стадиями рака легких и постепенно увеличивается по мере прогрессирования заболевания [34]. Экспрессию белка GAGE оценивали методом иммуногистохимии в 61 образце карциномы пищевода (40 аденокарцином и 21 образец плоскоклеточного рака), 50 образцах карциномы желудка и 141 образце колоректального

рака. Самая высокая частота экспрессии была обнаружена при плоскоклеточном раке пищевода: положительное окрашивание наблюдалось в 29 % случаев. Экспрессия белка GAGE при аденокарциноме пищевода наблюдалась в 2–24 % случаев и существенно не отличалась от экспрессии GAGE при разных типах аденокарциномы желудка [35].

В другой работе описывается экспрессия GAGE при раке щитовидной железы и показано, что она не связана с клиническим исходом. Для анализа были доступны данные 117 пациентов, перенесших хирургическое лечение по поводу заболевания щитовидной железы. Уровни экспрессии GAGE анализировали методом иммуногистохимии. Ни в нормальной щитовидной железе, ни в зобе GAGE не экспрессировался. При папиллярной и фолликулярной карциноме белок GAGE присутствовал в 10,8 % случаев, при медуллярной карциноме экспрессия антигена GAGE составила 92,9 %. В случаях плохо дифференцированной и анапластической карцином экспрессия GAGE составляла 66,7 %. Наблюдалась статистически значимая связь между экспрессией GAGE и полом ($p = 0,043$). Однако не было связи между экспрессией и выживаемостью пациентов ни при одном из проанализированных опухолевых образований. Текущее исследование выявило четкую картину экспрессии GAGE в злокачественных опухолях щитовидной железы, что указывает на то, что он потенциально превосходит существующие биомаркеры рака щитовидной железы [36].

Экспрессия генов семейства *GAGE* была обнаружена у 1/3 пациентов с множественной миеломой. Их экспрессия была идентифицирована как независимый прогностический фактор [37]. GAGE-4 и GAGE-8 представляют собой антигены с более высокой частотой экспрессии у пациентов с рецидивом множественной миеломы, чем при недавно диагностированном заболевании [38]. Было показано, что GAGE-1 и GAGE-12 сверхэкспрессируются у пациентов, у которых гены, участвующие в клеточном цикле и пролиферации, были сверхэкспрессированы, что подтверждает связь между генами РТА и прогнозом [39, 40]. В другом исследовании изучалась связь с прогнозом при множественной миеломе. Экспрессия генов семейства *GAGE* была изучена методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в 15 нормальных тканях, пуле из 10 нормальных образцов костного мозга, 3 нормальных миндалин и аспиратов костного мозга от 6 здоровых доноров, 3 моноклональных гаммапатий неопределенной значимости (MGU), 5 солитарных плазмочитом, 39 образцов множественной миеломы (95 % на поздней стадии) и линии клеток MMU266. Выявленная частота экспрессии GAGE у пациентов с множественной миеломой составляла 33 %. Регрессионная модель Кокса показала, что

экспрессия генов семейства *GAGE* была независимым прогностическим фактором при анализе всех пациентов. Обнаружено, что худший прогноз связан с экспрессией генов семейства *GAGE* [37].

Экспрессия мРНК гена *GAGE* была выявлена у 13 из 52 исследованных больных раком поджелудочной железы и у 1 из 8 больных с хроническим панкреатитом. Исследовались клетки поджелудочной железы, полученные методом биопсии. Наличие *GAGE* у больных хроническим панкреатитом позволяет рассматривать данное состояние как предрак [41].

Также изучалась экспрессия *GAGE* при опухолях желудочно-кишечного тракта. Анализ экспрессии *GAGE* проводили иммуногистохимическими методами. Из 51 доступного случая мужчин было 30 (59 %), а женщин – 21 (41 %); средний возраст 66 ± 15 лет (диапазон – 29–87 лет). Первичные очаги опухоли были следующими: желудок – 63 % (32/51) случаев, тонкая кишка – 35 % (18/51) случаев, другая локализация – 2 % (1/51) случаев. Все опухоли были иммуногистохимически положительны на антигены стволовых клеток CD117 и CD34. При раке желудка экспрессия *GAGE* связана с большим объемом опухоли и большей скоростью пролиферации. Экспрессия *GAGE* была обнаружена у 6 (12 %) из 51 пациента с раком желудка. Гастроинтестинальные стромальные опухоли с высокой степенью злокачественности с большей вероятностью экспрессируют *GAGE* ($p = 0,002$) по сравнению с менее агрессивными опухолями. Средний размер отрицательных и положительных по *GAGE* опухолей составил 4,0 и 8,0 см соответственно. Все пациенты с экспрессией *GAGE* имели умеренный или высокий риск рецидива в соответствии с установленными критериями риска. Наличие *GAGE* коррелирует со скоростью митоза ($p = 0,001$) и размером опухоли ($p = 0,02$), но не с локализацией опухоли ($p = 0,6$) [42].

У пациентов с хроническим панкреатитом РТА *GAGE-2* экспрессировались в 16 % (4/24) случаев, но гуморального иммунного ответа не наблюдалось. Несмотря на обнаружение мРНК *GAGE* у 1 из 9 пациентов с хроническим панкреатитом, не наблюдалось никакого гуморального иммунного ответа против *GAGE* в 15 образцах сыворотки, полученных от пациентов с хроническим панкреатитом [22].

Анализ экспрессии РТА с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимии у больных медуллобластомой показал, что *GAGE* присутствует в 64 % (16/25) случаев [43]. При раке печени экспрессия происходит относительно редко. Методом иммуногистохимии исследовались образцы, полученные от 146 больных с гепатоцеллюлярной карциномой, 13 больных с внутрипеченочной холангиокарциномой, 37 больных с внепеченочными холангиокарциномами и 32 больных с карциномой желчного пузыря. Из 146 гепато-

целлюлярных карцином белки группы *GAGE* обнаружены в 11 % случаев. Кроме того, экспрессия *GAGE* коррелировала со снижением общей выживаемости у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой ($p = 0,01$). Экспрессия белка *GAGE* обнаружена всего в 3 % случаев рака желчного пузыря. У больных с внутри- и внепеченочными холангиокарциномами экспрессии не выявлено [44].

Проводилась также иммуногистохимическая оценка экспрессии *GAGE* у 210 случайно выбранных первичных больных инвазивными видами рака молочной железы. Полученные данные были сопоставлены с клинико-патологическими параметрами и исходными данными, включая безрецидивную и общую выживаемость. Экспрессия *GAGE* была обнаружена в 17 (12,8 %) проанализированных случаях. Локализация *GAGE* была в основном цитоплазматической с некоторым редким участием ядра. Умеренная экспрессия была обнаружена в 9 (6,8 %) и сильная экспрессия в 8 (6,0 %) случаях [45].

При уротелиальной карциноме из 94 исследованных образцов от пациентов ≈ 30 % дали положительное окрашивание как в цитоплазме, так и в ядрах. При этом экспрессия белка *GAGE* не была связана с рецидивами и исходами выживания [46].

Экспрессия *GAGE* упоминается при мезотелиоме. Три первичные культуры (MES-CM98, MES-MM98 и MES-OC99) и 3 долговременные культуры (MPP-89, MES-1 и MES-2) клеток мезотелиомы были проанализированы на предмет их конститутивной экспрессии РТА. Анализ ОТ-ПЦР выявил частую экспрессию РТА, принадлежащего к семейству генов *GAGE* [47]. Наличие антигенов X-хромосомных РТА в опухолях зародышевых клеток было исследовано в 74 семиномах яичек, включая 72 классические семиномы и 2 сперматоцитарные семиномы: *GAGE* экспрессировался в 63 из 74 случаев [48].

Экспрессию гена *GAGE* определяли также в образцах клеточных линий меланомы, где она достигала 95,5 % [49]. Кроме того, экспрессия гена *GAGE* встречается при раке головы и шеи и отрицательно влияет на прогноз [50].

Интересно, что белки *GAGE* могут также использоваться для определения прогрессирования заболевания, поскольку их экспрессия коррелирует с плохим прогнозом при раке желудка, пищевода и нейробластоме [51–53].

Перспективы применения белков группы *GAGE* в качестве мишени для специфической иммунотерапии

Анализ экспрессии *GAGE* у больных онкологическими заболеваниями показал, что белки *GAGE* имеют более широкий профиль экспрессии в нормальных тканях, чем многие РТА. Экспрессия большинства

РТА ограничена зародышевыми клетками взрослого мужчины и зародышевыми клетками плода обоих полов, но экспрессия GAGE также сохраняется в подгруппе ооцитов взрослого яичника [27]. Кроме того, белки GAGE играют роль в клетках Лейдига и Сертоли, находящихся на стадии эмбрионального развития. Экспрессия может наблюдаться в течение нескольких недель во 2-м триместре беременности [54]. Из-за иммунных привилегий зародышевых клеток (низкая или нулевая экспрессия HLA класса I и гематоэнцефалический барьер) и незрелого состояния адаптивной иммунной системы плода экспрессия GAGE в половых и других клетках плода вероятнее всего не будет препятствовать применению методов GAGE-направленной иммунотерапии [2]. Соответственно, клеточные и гуморальные иммунные ответы на белки GAGE были обнаружены при меланоме [33].

Интересно, что иммуногистохимический анализ показал значительные различия в уровне экспрессии GAGE в опухолях, и большинство положительных опухолей также включают GAGE-отрицательные клетки. Это может иметь значимые последствия для разработки противораковых вакцин, распознающих GAGE, поскольку GAGE-отрицательные клетки в GAGE-положительных опухолях могут избежать иммунотерапевтического воздействия. Однако проблема гетерогенности может быть преодолена путем включения ингибиторов ДНК-метилтрансфераз и гистондеацетилаз в терапевтическое лечение, поскольку было показано, что они индуцируют экспрессию GAGE в раковых клетках [52, 55].

Важно понимать, что белковые продукты генов GAGE имеют более 95 % гомологии, кроме GAGE-1, который имеет уникальный С-конец, кодируемый дополнительным экзоном, с учетом умеренной гомологии 80 % в сравнении с другими генами семейства. Таким образом, специальные антитела, разработанные против отдельных белков семейства GAGE, с высокой вероятностью будут обладать кроссреактивностью среди белков группы GAGE [20].

Заключение

Семейство РТА GAGE представляет собой очень интересный объект для дальнейших исследований, и их продолжение может сыграть важную роль в развитии методов терапии опухолей. Экспрессируясь в раковых клетках, белки GAGE провоцируют против них гуморальный и клеточный иммунный ответ. Это подразумевает, что они вполне соответствуют требованиям, предъявляемым к мишеням для иммунотерапии опухолей.

Отсутствие экспрессии GAGE в большинстве здоровых тканей позволяет рассматривать данные белки как возможный диагностический и прогностический маркер раковых заболеваний, который в дальнейшем можно использовать для оценки злокачественности и мониторинга опухолей для подбора тактики лечения. К настоящему моменту в России известен опыт успешного создания бактериального продуцента белка GAGE1, предназначенного для дальнейших разработок противоопухолевых препаратов [56], а также оценки экспрессии транскриптов генов группы GAGE в клеточных линиях и в опухолях, полученных от больных меланомой [49, 57, 58].

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

1. Stevenson B.J., Iseli C., Panji S. et al. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. *BMC Genomics* 2007;8:129. DOI: 10.1186/1471-2164-8-129
2. Fijak M., Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev* 2006;213:66–81. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00438.x
3. Simpson A.J., Caballero O.L., Jungbluth A. et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; (8):615–25. DOI: 10.1038/nrc1669
4. Head J.R., Billingham R.E. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* 1985;40(3):269–75. DOI: 10.1097/00007890-198509000-00010
5. Hutter H., Dohr G. HLA expression on immature and mature human germ cells. *J Reprod Immunol* 1998;38(2):101–22. DOI: 10.1016/s0165-0378(98)00032-1
6. Kirkin A.F., Dzhandzhugazyan K.N., Zeuthen J. Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest* 2002;20(2):222–36. DOI: 10.1081/cnv-120001150
7. Van Der Bruggen P., Zhang Y., Chaux P. et al. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 2002;188(1):51–64. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2002.18806.x
8. Kawabata R., Wada H., Isobe M. et al. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer* 2007;120(10):2178–84. DOI: 10.1002/ijc.22583
9. Uenaka A., Wada H., Isobe M. et al. T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun* 2007;7:9.
10. Odunsi K., Qian F., Matsuzaki J. et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(31):12837–42. DOI: 10.1073/pnas.0703342104
11. Thurner B., Haendle I., Röder C. et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190(31):1669–78. DOI: 10.1084/jem.190.11.1669
12. Marchand M., van Baren N., Weynants P. et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene *MAGE-3* and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80(2):219–30. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990118)80:2<219::aid-ijc10>3.0.co;2-s
13. Jäger E., Karbach J., Gnjatich S. et al. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A 2006;103(39):14453–8. DOI: 10.1073/pnas.0606512103
14. Davis I.D., Chen W., Jackson H. et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29):10697–702. DOI: 10.1073/pnas.0403572101
 15. Burgdorf S.K., Fischer A., Claesson M.H. et al. Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(2):201–6.
 16. Reynolds S.R., Celis E., Sette A. et al. HLA-independent heterogeneity of CD8⁺ T cell responses to MAGE-3, Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, MC1R, and TRP-2 in vaccine-treated melanoma patients. *J Immunol* 1998;161(12):6970–6.
 17. Reynolds S.R., Celis E., Sette A. et al. Identification of HLA-A*03, A*11 and B*07-restricted melanoma-associated peptides that are immunogenic in vivo by vaccine-induced immune response (VIIR) analysis. *J Immunol Methods* 2000;244(1–2):59–67. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00254-4
 18. Van den Eynde B., Peeters O., De Backer O. et al. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 1995;182(3):689–98. DOI: 10.1084/jem.182.3.689
 19. Traversari C., van der Bruggen P., Van den Eynde B. et al. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 1992;35(3):145–52. DOI: 10.1007/BF00185107
 20. Gjerstorff M.F., Ditzel H.J. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members. *Tissue Antigens* 2008;71(3):187–92. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00997.x
 21. Cilensek Z.M., Yehiely F., Kular R.K., Deiss L.P. A member of the GAGE family of tumor antigens is anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. *Cancer Biol Ther* 2002;1(4):380–7.
 22. Wadle A., Kubuschok B., Imig J. et al. Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006;119(1):117–25. DOI: 10.1002/ijc.21744
 23. Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999;248(1):30–43. DOI: 10.1006/excr.1999.4455
 24. Lampros M., Vlachos N., Voulgaris S., Alexiou G.A. The Role of Hsp27 in chemotherapy resistance. *Biomedicine* 2022;10(4):897. DOI: 10.3390/biomedicine10040897
 25. Cao X., Hou J., An Q. et al. Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resist Updat* 2020;49:100671. DOI: 10.1016/j.drug.2019.100671
 26. Tuxhorn J.A., Ayala G.E., Smith M.J. et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 2002;8(9):2912–23.
 27. Gjerstorff M.F., Johansen L.E., Nielsen O. et al. Restriction of GAGE protein expression to subpopulations of cancer cells is independent of genotype and may limit the use of GAGE proteins as targets for cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2006;94(12):1864–73. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603163
 28. De Backer O., Arden K.C., Boretto M. et al. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 1999;59(13):3157–65.
 29. Ruschenburg I., Kubitz A., Schlott T. et al. MAGE-1, GAGE-1/-2 gene expression in FNAB of classic variant of papillary thyroid carcinoma and papillary hyperplasia in nodular goiter. *Int J Mol Medicine* 1999;4(4):445–8. DOI: 10.3892/ijmm.4.4.445
 30. Mischo A., Kubuschok B., Ertan K. et al. Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int J Cancer* 2006;118(3):696–703. DOI: 10.1002/ijc.21352
 31. Kobayashi Y., Higashi T., Nouse K. et al. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000;32(4):612–7. DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80223-8
 32. Gillespie A.M., Rodgers S., Wilson A.P. et al. MAGE, BAGE and GAGE: tumour antigen expression in benign and malignant ovarian tissue. *Br J Cancer* 1998;78(6):816–21. DOI: 10.1038/bjc.1998.585
 33. Bazhin A.V., Wiedemann N., Schnölzer M. et al. Expression of GAGE family proteins in malignant melanoma. *Cancer Lett* 2007;251(2):258–67. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.022
 34. Gjerstorff M.F., Pöhl M., Olsen K.E., Ditzel H.J. Analysis of GAGE, NY-ESO-1 and SP17 cancer/testis antigen expression in early stage non-small cell lung carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13:466. DOI: 10.1186/1471-2407-13-466
 35. Chen Y.T., Panarelli N.C., Piotti K.C., Yantiss R.K. Cancer-testis antigen expression in digestive tract carcinomas: frequent expression in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Cancer Immunol Res* 2014;2(5):480–6. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0124
 36. Melo D.H., Mamede R.C.M., Neder L. et al. Expression of cancer/testis antigens MAGE-A, MAGE-C1, GAGE and CTAG1B in benign and malignant thyroid diseases. *Oncol Lett* 2017;14(6):6485–96. DOI: 10.3892/ol.2017.7072
 37. Andrade V.C.C., Vettore A.L., Felix R.S. et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun* 2008;8:2.
 38. Van Duin M., Broyl A., de Knecht Y. et al. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy. *Haematologica* 2011;96(11):1662–9. DOI: 10.3324/haematol.2010.037978
 39. Moreaux J., Klein B., Bataille R. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 2011;96(4):574–82. DOI: 10.3324/haematol.2010.033456
 40. Ghafoori-Fard S., Seifi-Alan M., Shamsi R. et al. Immunotherapy in multiple myeloma using cancer-testis antigens. *Iran J Cancer Prev* 2015;8(5):e3755. DOI: 10.17795/ijcp-3755
 41. Kubuschok B., Xie X., Jesnowski R. et al. Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Cancer* 2004;109(4):568–75. DOI: 10.1002/ijc.20006
 42. Ghabban T., Perez D.R., Vashist Y.K. et al. Expression of cancer testis antigens CT10 (MAGE-C2) and GAGE in gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Surg Oncol* 2014;40(10):1307–12. DOI: 10.1016/j.ejso.2014.03.011
 43. Oba-Shinjo S.M., Caballero O.L., Jungbluth A.A. et al. Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun* 2008;8:7.
 44. Riener M., Wild P.J., Soll C. et al. Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009;124(2):352–7. DOI: 10.1002/ijc.23966
 45. Balafoutas D., Hausen A., Mayer S. et al. Cancer testis antigens and NY-BR-1 expression in primary breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *BMC Cancer* 2013;13:271. DOI: 10.1186/1471-2407-13-271
 46. Sharma P., Shen Y., Wen S. et al. Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(18):5442–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0527
 47. Sigalotti L., Coral S., Altomonte M. et al. Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and immunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 2002;86(6):979–82. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600174
 48. Chen Y., Chiu R., Lee P. et al. Chromosome X-encoded cancer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. *Hum Reprod* 2012;26(12):3232–43. DOI: 10.1093/humrep/der330

49. Danilova A., Misyurin V., Novik A. et al. Cancer/testis antigens expression during cultivation of melanoma and soft tissue sarcoma cells. *Clin Sarcoma Res* 2020;10:3. DOI: 10.1186/s13569-020-0125-2
50. Cuffel C., Rivals J., Zaugg Y. et al. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011;128(11):2625–34. DOI: 10.1002/ijc.25607
51. Zambon A., Mandruzzato S., Parent A. et al. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2001;91(10):1882–8.
52. Kong U., Koo J.Y., Choi K.H. et al. The expression of GAGE gene can predict aggressive biologic behavior of intestinal type of stomach cancer. *Hepatogastroenterology* 2004;51(59):1519–23.
53. Cheung I.Y., Chi S.N., Cheung N.K. Prognostic significance of GAGE detection in bone marrows on survival of patients with metastatic neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000;35(6):632–634. DOI: 10.1002/1096-911x(20001201)35:6<632::aid-mpo31>3.0.co;2-1
54. Gjerstorff M.F., Kock K., Nielsen O., Ditzel H.J. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod* 2007;22(4):953–60. DOI: 10.1093/humrep/del494
55. D'Alessio A.C., Weaver I.C.G., Szyf M. Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Mol Cell Biol* 2007;27(21):7462–74. DOI: 10.1128/MCB.01120-07
56. Финашутина Ю.П., Мисюрин В.А., Пушкова Е.Н., Мисюрин А.В. Способ получения рекомбинантного белка GAGE1 человека. Патент на изобретение RU 2652890C1 от 05.03.2018. Finashutina Yu.P., Misyurin V.A., Pushkova E.N., Misyurin A.V. Method of obtaining recombinant human GAGE1 protein. Patent for the invention RU 2652890C1, dated 05.03.2018.
57. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;1:29–39. Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Burova O.S. et al. Expression of cancer-testicular antigens in human melanoma cells. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2010;1:29–39. (In Russ.).
58. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Вишневская Я.В. и др. Экспрессия генов раково-тестикулярных антигенов в первичной меланоме кожи человека. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2010;21(2):52–65. Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Vishnevskaya Ya.V. et al. Expression of cancer-testicular antigen genes in primary human skin melanoma. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2010;21(2):52–65.

Вклад авторов

А.А. Рудакова: сбор и анализ данных литературы, написание и редактирование текста статьи;

А.Д. Ширин, Н.В. Голубцова, М.В. Пинюгина: сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи;

В.А. Мисюрин: разработка концепции и дизайна обзора, сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи.

Author's contribution

A.A. Rudakova: literature data collection and analysis, article writing, editing of the article;

A.D. Shirin, N.V. Golubtsova, M.V. Pinyugina: literature data collection and analysis, editing of the article;

V.A. Misyurin: concept and design, literature data collection and analysis, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

А.Д. Ширин / A.D. Shirin: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>

Н.В. Голубцова / N.V. Golubtsova: <https://orcid.org/0000-0002-8630-1968>

М.В. Пинюгина / M.V. Pinyugina: <https://orcid.org/0000-0003-0318-3896>

В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 26.12.2022. Принята к публикации: 20.02.2023.

Article received: 26.12.2022. Accepted for publication: 20.02.2023.