

УДК:577.27:616-006.66

Связь экспрессии изоформ аденозинкиназы и эктонуклеотидаз CD39/CD73 в крови больных колоректальным раком

Г. А. Жулай^{1*}, М. И. Шибеев²¹Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, 185910 Россия²Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, 185910 Россия

*E-mail: zhgali-111@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022

Принята к печати 03.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11871

РЕФЕРАТ Опухолевые клетки способны создавать богатую аденозином иммуносупрессорную среду, что может препятствовать успешной противоопухолевой иммунотерапии. В настоящее время разрабатываются подходы, нацеленные на подавление продукции аденозина или его сигналов, включая использование антител, ингибирующих CD39 или CD73, и антагонистов рецепторов аденозина. Однако избытие путей, управляющих балансом АТФ-аденозин, а также недостаточно изученные пути внутриклеточной регуляции аденозина не позволяют добиться ожидаемого успеха. Особый интерес представляет аденозинкиназа (АДК), фермент, который катализирует превращение аденозина в аденозинмонофосфат, регулируя тем самым его уровень. Изучен уровень экспрессии гена АДК, а также уровень мРНК его длинной (АДК-*L*) и короткой (АДК-*S*) изоформ в образцах периферической крови больных колоректальным раком (КРР) ($n = 31$) и в контрольных образцах крови здоровых доноров ($n = 17$). Проведен анализ взаимосвязи уровней экспрессии гена аденозинкиназы и генов CD39, CD73 и A2aR. Показано, что в группе больных КРР с III–IV стадиями уровень мРНК АДК-*L* снижен ($p < 0.001$) по сравнению с контролем. У больных КРР впервые выявлена средняя корреляционная связь между уровнем экспрессии CD39 и АДК-*S* ($r = -0.468$ при $p = 0.043$) и между CD73 и АДК-*L* ($r = 0.518$ при $p = 0.0232$). С помощью проточной цитофлуориметрии оценено содержание CD8⁺, CD4⁺ и регуляторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, и их связь с уровнем мРНК аденозинкиназы у больных КРР. Однако статистически значимых корреляционных связей не обнаружено.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденозинкиназа, АДК-*S*, АДК-*L*, CD39, CD73, CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, Treg, колоректальный рак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АДК – аденозинкиназа; АДК-*L* – длинная изоформа аденозинкиназы; АДК-*S* – короткая изоформа аденозинкиназы; CD39 – эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза, ENTPD1; CD73 – экто-5'-нуклеотидаза, 5'NT; A2aR – рецептор аденозина A2A; КРР – колоректальный рак.

ВВЕДЕНИЕ

Роль внеклеточного аденозина в микроокружении опухоли хорошо изучена [1]. Аденозин может регулировать врожденные и адаптивные иммунные реакции [2], снижая действие эффекторного звена и стимулируя иммуносупрессорное звено. Поэтому внеклеточный аденозин представляет собой барьер для противоопухолевой иммунотерапии. Терапевтический потенциал блокады ферментов – эктонуклеотидаз CD39 (эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза, ENTPD1) и CD73

(экто-5'-нуклеотидаза, 5'NT), расщепляющих АТФ до аденозина, а также ингибирование аденозиновых рецепторов (в основном A2a) показан в доклинических исследованиях и проходит проверку на I/II стадиях клинических испытаний для онкологических больных [3]. Однако пока не удалось добиться эффективности, ожидаемой по результатам доклинических исследований [4].

Многочисленные пути, управляющие балансом АТФ и аденозина, остаются недостаточно хорошо изученными. При разработке подходов к блокаде

аденозинового сигнального пути слабо учитывается внутриклеточная регуляция аденозина. В последнее время обсуждается не только «классический» путь образования внеклеточного аденозина из АТФ эктонуклеотидазами CD39-CD73, но и роль альтернативного пути, в котором участвует внеклеточный никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺), в прогрессии рака [5]. Поэтому актуальным представляется изучение и других компонентов метаболизма аденозина в условиях развития опухоли.

Концентрация аденозина регулируется аденозинконвертирующими ферментами: аденозинкиназой (ADK) и аденозиндезаминазой [6, 7]. ADK добавляет остаток фосфорной кислоты к аденозину и превращает его в АМР. Аденозиндезаминаза удаляет аминогруппу с молекулы аденозина с образованием инозина. Кроме того, уровень аденозина может регулироваться путем его доставки во внеклеточное пространство через двунаправленные переносчики нуклеотидов.

Особый интерес представляет аденозинкиназа, которая регулирует доступность аденозина и является важным звеном сложных гомеостатических и метаболических сетей [8]. Баланс аденозина и ADK строго поддерживается в здоровых клетках, а изменения экспрессии этого фермента приводят к разной степени активации аденозиновых рецепторов, что часто и определяет роль ADK в развитии патологий [9]. ADK участвует не только в метаболизме пуринов, но и в регуляции транsmетилирования. Показана связь экспрессии ADK с метилированием ДНК. Использование специфических ингибиторов ADK может дозозависимо снижать уровень глобального метилирования ДНК в клетках HeLa [10]. ADK человека представлена двумя изоформами, которые отличаются молекулярной массой и, предположительно, функциями. Короткая изоформа, ADK-S, находится в цитоплазме. Она обеспечивает рутинное метаболическое удаление аденозина в нормальных условиях путем его фосфорилирования с образованием АМР. Основная функция ADK-S состоит в регуляции уровня внеклеточного тканевого аденозина. Длинная изоформа ADK-L локализуется в ядре и биохимически напрямую связана с S-аденозилметионин-зависимым путем транsmетилирования, который управляет метилированием ДНК и гистонов. Высокий уровень и активность ADK-L связаны с повышенным глобальным метилированием ДНК [1].

Роль ADK в развитии рака изучена недостаточно. Результаты проведенных исследований [10–15] указывают на потенциальную роль ADK в канцерогенезе, в частности колоректального рака (КРР) [14], рака молочной железы [15] и печени [12]. На воз-

можность участия ADK в развитии опухоли указывает также связь ADK с клеточной пролиферацией в процессе онтогенеза и с ангиогенезом, а также изменения в экспрессии этого фермента в опухолевой ткани и его ассоциация с эпигенетической регуляцией [8].

КРР – одно из распространенных злокачественных заболеваний, входит в число основных причин смертности от рака. Значимую роль в патогенезе КРР отводят аденозинергическому пути [16], тесно связанному с супрессией адаптивного иммунитета. Однако связь ADK с иммунными механизмами при КРР не исследована.

В связи с этим целью исследования состояла в изучении уровня мРНК ADK, ADK-L, ADK-S и его связи с содержанием Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, в периферической крови больных КРР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования служила венозная кровь, собранная из локтевой вены натощак в пробирки с антикоагулянтом К3ЕDТА. В работе проанализирован 31 образец крови пациентов в возрасте 65 ± 12.4 лет с аденокарциномой толстой кишки в основном (91%) умеренной степени дифференцировки. Диагноз у всех пациентов установлен на основании клинико-инструментального обследования и подтвержден гистологически. Клиническая характеристика пациентов представлена в *табл. 1*. Критериями включения пациентов в исследование были возраст старше 18 лет и подтвержденный диагноз рака толстой киш-

Таблица 1. Характеристика участников исследования

Показатель		Больные КРР	Здоровые доноры
Количество		31	17
Пол	М	11 (35.5%)	6 (35.3%)
	Ж	20 (64.5%)	11 (64.7%)
Возраст, медиана (min–max)		65.0 лет (45–78 лет)	55.0 лет (28–79 лет)
Стадия КРР	1–2	16 (51.6%)	–
	3–4	15 (48.3%)	
Степень дифференцировки опухоли	G1	3 (9.7%)	–
	G2	23 (74.2%)	
	G3	5 (16.1%)	

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Праймер 5' → 3'	
	Прямой	Обратный
<i>ADK</i>	TTACTACGAGCAGAATGAGCAG	TGGCAGCAGCAAGATTAGC
<i>ADK-L</i>	TGTAGAGCCAAAGTGGGGTG	GCCTCCACCTTCAGCTTTTGTG
<i>ADK-S</i>	AAGCAGTTGCTGTGGTACCTG	AGCAGAGGATTTCCCATGCCA
<i>A2AR</i>	CTTGGGTTCTGAGGAAGCAG	CAGCAGCTCCTGAACCCTAG
<i>CD39</i>	AGCAGCTGAAATATGCTGGC	GAGACAGTATCTGCCGAAGTCC
<i>CD73</i>	ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA	ACACTTGCCAGTAAAATAGGG
<i>GAPDH</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAG	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT

ки. Критериями исключения были неoadъювантная терапия, аутоиммунные и воспалительные заболевания в последние 3 месяца. В качестве контроля проанализированы 17 образцов крови здоровых лиц соответствующего возраста (56.10 ± 17.70 лет). Исследование проведено согласно требованиям Хельсинкской декларации 2013 г. и одобрено Комитетом по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.). Все обследованные лица подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование выполнено с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Анализ экспрессии генов

Суммарную РНК выделяли из крови с помощью реагента TRIzol LS (ThermoFisher Scientific, США) и очищали от примесей ДНК, обрабатывая образцы ДНКазой I (Lucigen, США). Количество и качество полученной РНК оценивали на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Синтез кДНК выполняли с использованием случайных гексапраймеров и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени проводили с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Евроген») в соответствии с инструкцией производителя на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США) в двух повторах и с контролем без матрицы. Экспрессию интересующих генов нормировали по экспрессии референсного гена *GAPDH*. Праймеры, использованные для оценки экспрессии генов *ADK*, *ADK-L*, *ADK-S*, *A2AR*, *CD39* и *CD73* («Синтол», Россия), представлены в табл. 2. Оптимальную температу-

ру отжига подбирали постановкой температурного градиента. Для *ADK*, *ADK-L*, *ADK-S*: денатурация кДНК 5 мин, 95°C; 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 61°C, 30 с; элонгация – 72°C, 30 с. Для *A2AR*, *CD39* и *CD73*: денатурация кДНК 5 мин, 95°C; 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 64°C, 30 с; элонгация – 72°C, 30 с. Специфичность ПЦР контролировали с помощью анализа кривых плавления. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где Ct – пороговый цикл, а ΔCt – разница между значениями пороговых циклов для референсного и целевого генов. Итоговый уровень экспрессии генов рассчитывали относительно уровня в контроле (здоровые доноры), принимая величину экспрессии каждого исследуемого гена в контроле за единицу. Данные представлены в относительных единицах, рассчитывали среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SE$).

Проточная цитофлуориметрия

Образцы цельной крови окрашивали антителами и затем инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте в соответствии с протоколом производителя. Эритроциты лизировали реагентом BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). В работе использовали следующие моноклональные антитела: CD3-PC5 (клон UCST1), CD4-FITC (клон OKT4), CD4-PC7 (клон OKT4), CD8-PC7 (клон RPA-T8), CD25-PC5 (клон BC96), CD127-PC7 (клон EBIORDR5), CD73-PE (клон AD2), CD39-PE (клон EBIOA1), CD39-FITC (клон EBIOA1) (eBioscience, США), а также соответствующие им изотипические контроли. Все события получены на цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 30000 событий в лимфоцитарном гейте, основанном на прямом и боковом светорассеянии. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Статистический анализ

Статистическая обработка материала и расчет показателей проведены с использованием программы GraphPad Prism v.7. Значимость различий между количественными показателями вычисляли, используя непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень экспрессии мРНК аденозинкиназы в периферической крови больных КРР

Опубликованы данные об экспрессии гена *ADK* в ткани КРР [14], однако не известно, как экспрессируется ген *ADK* и его изоформы в периферической крови больных КРР и как он связан с клиническими признаками заболевания. Нами оценено относительное содержание мРНК гена *ADK* и его изоформ в периферической крови пациентов с КРР. Сравнение группы больных КРР и здоровых доноров выявило пониженный уровень мРНК *ADK-L* ($p = 0.002$) при КРР. Содержание мРНК гена *ADK* и изоформы *ADK-S* не отличалось от содержания в контрольной группе. Показано, что в образцах крови больных с III–IV стадиями КРР уровень мРНК *ADK-L* снижен ($p < 0.001$) по сравнению со здоровыми донорами (рис. 1). При этом различия между уровнями мРНК *ADK-L* у больных на начальных стадиях заболевания (I–II стадии) и в контрольной группе не имели статистической значимости. Содержание мРНК гена *ADK* и изоформы *ADK-S* в образцах крови больных с начальными и поздними стадиями КРР также было приближено к уровню у здоровых лиц.

В работе рассмотрена также связь между уровнями мРНК исследуемого гена и клиническими признаками заболевания. Выявлена средняя отрицательная корреляция между содержанием мРНК *ADK-L* и размером опухоли (T2–T4), которая составила 0.508 при $p = 0.038$. Однако не обнаружено значимых корреляционных связей между уровнем мРНК *ADK-L* и стадией заболевания. Различия в уровне мРНК гена аденозинкиназы у больных КРР с наличием и отсутствием отдаленных метастазов (M0–M1) или метастазов в регионарные лимфатические узлы (N0–N2) не имели статистической значимости.

Уровень внеклеточного аденозина регулируется сетью ферментов, в том числе и эктонуклеотидазами CD39 и CD73, которые играют ключевую роль в канцерогенезе [17]. Ранее нами было показано, что в периферической крови больных КРР повышен

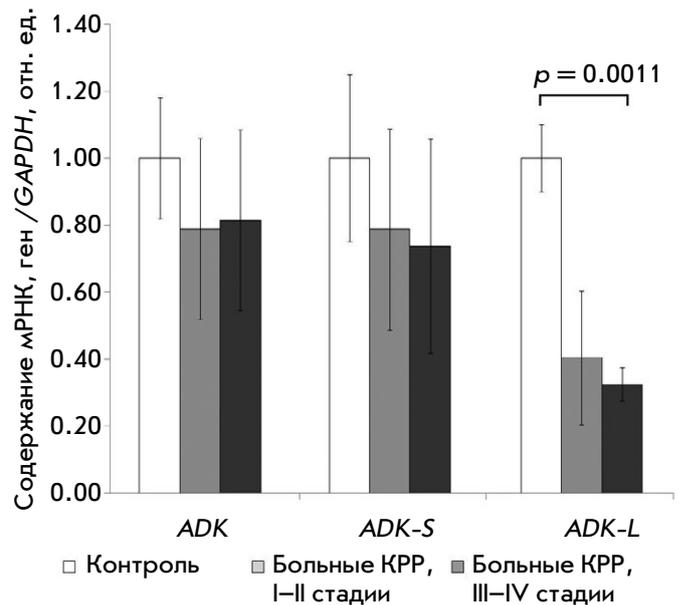


Рис. 1. Изменение относительного уровня мРНК гена *ADK* и изоформ *ADK-S*, *ADK-L* в крови пациентов с КРР по сравнению со здоровыми донорами. Относительный уровень мРНК в контроле принят за 1. Нормализация выполнена по мРНК гена *GAPDH*

Таблица 3. Значения коэффициентов корреляции между уровнем мРНК гена *ADK*, изоформ *ADK-S*, *ADK-L* и содержанием мРНК генов *CD39*, *CD73*, *A2AR* при колоректальном раке

Уровень мРНК	<i>ADK</i>		<i>ADK-S</i>		<i>ADK-L</i>	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
<i>A2AR</i>	-0.284	0.21	0.02	0.9346	0.406	0.0843
<i>CD39</i>	-0.038	0.097	-0.468	0.043	-0.329	0.168
<i>CD73</i>	-0.033	0.889	-0.16	0.511	0.518	0.0232

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели.

уровень мРНК гена *CD39*, тогда как уровень мРНК гена *CD73* был таким же, как у здоровых лиц [18]. Нами проанализирована связь между относительной экспрессией генов *CD39*, *CD73* и *A2AR* и экспрессий гена *ADK* и его изоформ в периферической крови больных КРР. Получены новые данные о существовании связи между экспрессией этих генов: выявлена отрицательная корреляция между относительным содержанием мРНК *ADK-S* и мРНК гена *CD39*. Показана положительная корреляционная связь уровней мРНК *ADK-L* и *CD73* (табл. 3).

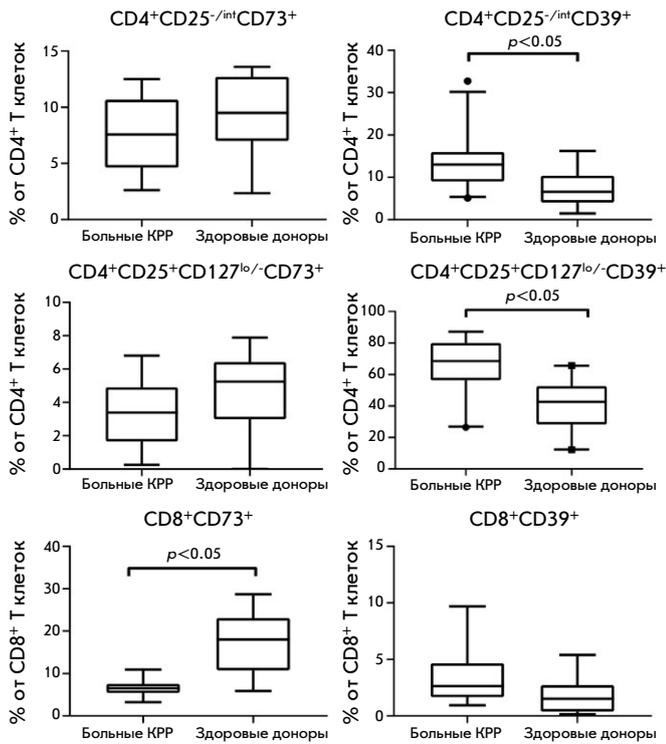


Рис. 2. Относительное содержание CD39⁺ и CD73⁺ Т-клеток в периферической крови больных КРП и здоровых доноров

Взаимосвязь между уровнем экспрессии гена ADK и содержанием CD39⁺/CD73⁺ Т-клеток

Установленная на уровне мРНК связь аденозинкиназы с эктонуклеотидазами CD39 и CD73 в периферической крови предполагает существование связи ADK с иммунными клетками, экспрессирующими CD39/CD73. Ключевое значение в противоопухолевом иммунном ответе имеет баланс эффектор-

ных CD8⁺, CD4⁺ Т-клеток и иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток (Treg). Эти лимфоциты, как и многие другие клетки, чувствительны к действию аденозина, которое проявляется в основном через аденозиновый рецептор A2aR, а также способны участвовать в продукции аденозина, используя экспрессию на своей поверхности CD39 и/или CD73 [3]. Для выявления связи между уровнем экспрессии ADK и уровнем Т-клеток, участвующих в генерации аденозина, проанализировано относительное содержание CD39⁺/CD73⁺ эффекторных Т-лимфоцитов (CD4⁺ Т-хелперов и CD8⁺ цитотоксических клеток) и супрессорных Treg-клеток у больных КРП (n = 20) и здоровых лиц (n = 17) (рис. 2).

Как у здоровых, так и у больных лиц, CD39-положительные клетки преобладали в популяции Treg-клеток, тогда как экспрессия CD73 была более характерна для CD8⁺ Т-клеток (рис. 3). Это отмечают и другие авторы [19]. Поскольку популяция эффекторных CD4⁺ Т-клеток содержит 3–5% Treg-клеток, которые характеризуются повышенной экспрессией CD25, то для исключения вклада Treg-клеток в экспрессию CD39/CD73 Т-хелперными клетками рассматривали фенотип CD4⁺CD25^{-int}.

Показано, что около 64% всех Treg-клеток в крови больных КРП были CD39⁺, что значимо отличалось от содержания Treg-клеток в крови здоровых доноров (p = 0.0008), у которых CD39⁺ Treg-клетки составили 42%. Достоверные различия показаны и для CD4⁺CD39⁺ Т-хелперов (p = 0.037). В популяции CD8⁺ Т-клеток больных КРП содержание CD73-положительных клеток было снижено (p = 0.024). Содержание CD73⁺ Treg-клеток, CD73⁺CD4⁺ Т-клеток и CD39⁺CD8⁺ Т-клеток у больных КРП было таким же, как в контроле.

Для оценки взаимосвязи ADK с содержанием CD39⁺/CD73⁺ Т-лимфоцитов проведен анализ воз-

Таблица 4. Значения коэффициентов корреляции между уровнем мРНК гена ADK, изоформ ADK-S, ADK-L и относительным содержанием CD39⁺ и CD73⁺ Т-клеток в крови больных колоректальным раком

Субпопуляция Т-клеток	ADK		ADK-S		ADK-L	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
CD8 ⁺ CD73 ⁺	0.107	0.840	0.178	0.713	-0.036	0.951
CD8 ⁺ CD39 ⁺	0.033	0.948	-0.217	0.581	0.126	0.295
CD4 ⁺ CD25 ^{-int} CD73 ⁺	-0.217	0.581	-0.300	0.437	0.393	0.295
CD4 ⁺ CD25 ^{-int} CD39 ⁺	-0.021	0.929	0.255	0.278	0.002	0.995
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD73 ⁺	-0.381	0.359	-0.381	0.360	0.256	0.549
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD39 ⁺	0.051	0.827	0.278	0.235	-0.151	0.522

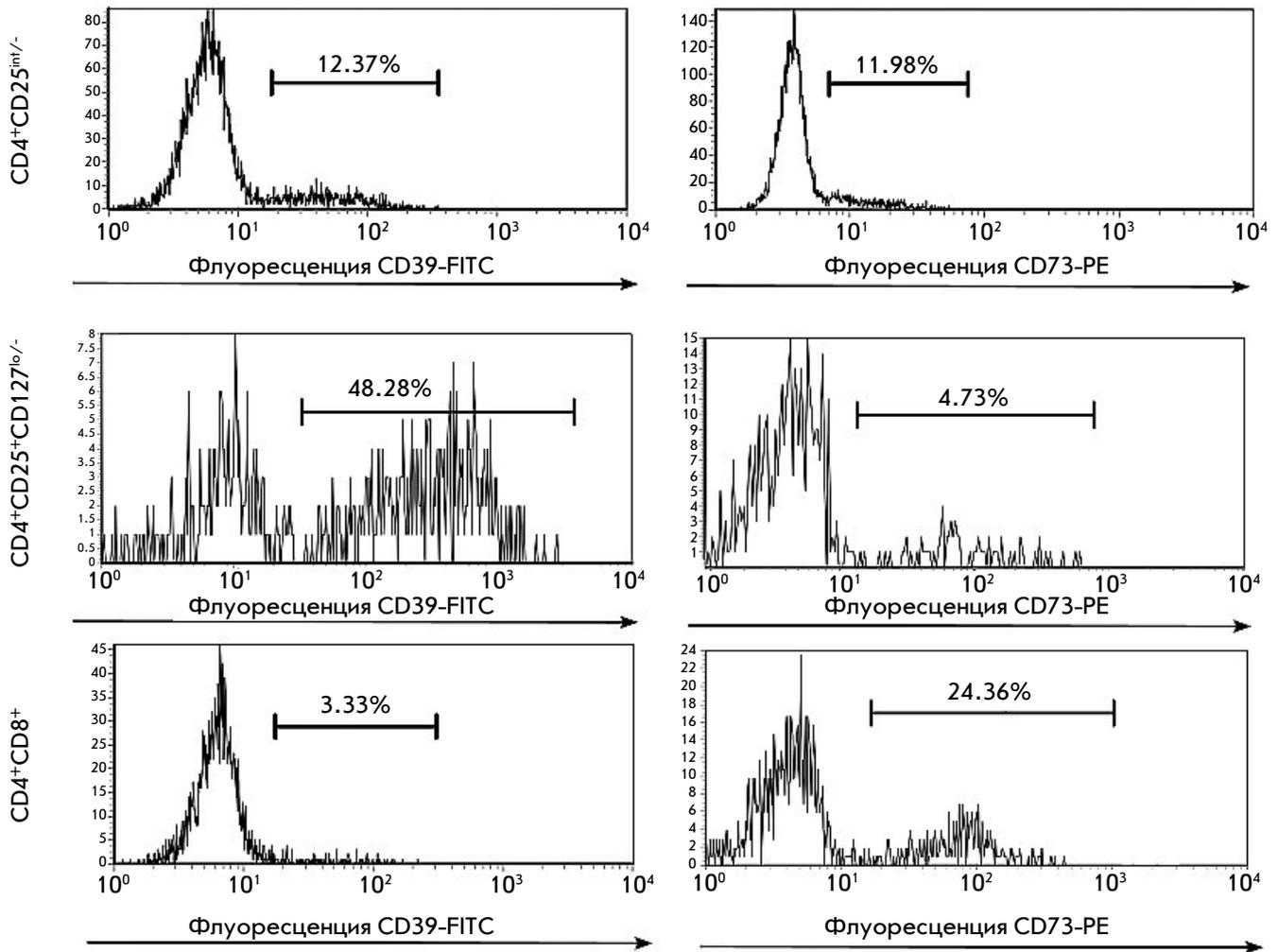


Рис. 3. Пример гистограмм распределения экспрессии CD39 и CD73 на поверхности CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток здорового донора. По оси X – интенсивность флуоресценции флуорохромов FITC и PE, конъюгированных с антителами к CD39 и CD73 соответственно. По оси Y показано количество событий в гейте лимфоцитов. Справа под горизонтальной линией отмечены клетки, экспрессирующие CD39/CD73, слева находятся клетки, негативные по экспрессии CD39/CD73

можных связей между уровнем мРНК гена *ADK*, его изоформ *ADK-L*, *ADK-S* и содержанием CD39/CD73-экспрессирующих Т-клеток в периферической крови больных КРР. Однако статистически значимых корреляционных связей не выявлено (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время установлено, что аденозинергический путь представляет интерес в качестве перспективной мишени для противоопухолевой терапии. Экспрессия и активность основных участников этого пути, CD39/CD73/A2aR, повышены в опухолевой ткани и часто ассоциируются с клиническими признаками заболевания и неблагоприятным про-

гнозом при некоторых типах рака [17]. В клинических испытаниях получены предварительный оптимальный профиль безопасности блокаторов A2aR и CD73 и повышенная общая частота ответа на них [4, 20]. Тем не менее, положительные результаты как монотерапии, так и комбинированной терапии были в основном ниже, чем ожидалось на основании доклинических исследований. Это указывает на необходимость более тонкого отбора пациентов или использования биомаркеров, которые могли бы прогнозировать и оптимизировать результаты терапии [4, 20].

Фермент ADK действует как регулятор уровня аденозина, превращая его в AMP. В настоящее

время нет четкого понимания роли ADK при развитии опухоли. Ранние работы показывают повышение уровня экспрессии гена *ADK* [14] и ферментативной активности ADK [21] в опухолевой ткани больных КРР по сравнению с нормальной тканью. У больных раком печени, напротив, уровень белка ADK был ниже, чем в здоровой ткани. Кроме того, в экспериментальной модели снижение уровня ADK в печени увеличивало чувствительность к острым токсическим эффектам канцерогена (диэтилнитрозамин) [12]. Ряд экспериментальных работ описывает ограничение пролиферации опухолевых клеток и индукцию апоптоза при обработке ингибиторами ADK, в том числе и в клеточной линии HT-29 колоректального рака [22]. Довольно мало известно о роли изоформ ADK при канцерогенезе. Так, Shamloo и соавт. [15] определили более значимую роль длинной изоформы ADK при раке молочной железы. Нокдаун гена этой изоформы приводит к событиям, предполагающим ее участие в митогенезе, канцерогенезе и инвазии опухолевых клеток. Практически не определен уровень ADK в периферической крови, а также связь ADK с активацией ключевых для противоопухолевого иммунного ответа популяций лимфоцитов ($CD8^+/CD4^+$ Т-клеток, Treg-клеток) у больных КРР.

Полученные нами результаты подтверждают изменение экспрессии ADK в патогенезе КРР. Согласно опубликованным данным, в опухолевой ткани идет локальное повышение активации ADK. Это может быть связано с накоплением аденозина в микроокружении опухоли и его активным метаболизмом. На периферии, в крови, напротив, мы наблюдали снижение уровня мРНК *ADK-L* в группе больных с III–IV стадиями КРР по сравнению с группой здоровых лиц, а также обратную связь между изменением уровня мРНК *ADK-L* у больных с распространенным процессом (T2–T4), тогда как уровень *ADK-S* не изменялся по сравнению с контролем.

Как известно, некоторые популяции лейкоцитов экспрессируют эктонуклеотидазы CD39/CD73 и могут участвовать в генерации аденозина [23], что может привести к иммунной супрессии и росту опухоли, в том числе и при КРР [3, 24]. В нашей работе обнаружены значимые корреляционные связи между уровнем мРНК гена *CD39* и мРНК *ADK-S* в периферической крови ($r = -0.468$ при $p = 0.043$), а также между уровнем мРНК гена *CD73* и мРНК *ADK-L* ($r = 0.518$ при $p = 0.0232$) у больных КРР.

Кроме того, не выявлена связь генной экспрессии ADK и изоформ с изменением экспрессии гена, кодирующего аденозиновый рецептор A2aA, активация которого на лимфоцитах способствует развитию иммунной супрессии.

В нашей работе впервые проанализирована связь между содержанием основных эффекторных и супрессорных популяций лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD39/CD73, и изменениями экспрессии ADK у больных КРР. Определение содержания $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клеток и Treg-клеток в периферической крови показало, что наиболее значимо при КРР изменяется содержание $CD39^+$ Т-клеток (табл. 3). Впервые проведен анализ связи между содержанием $CD39^+$ и $CD73^+$ Т-клеток и содержанием мРНК ADK и ее изоформ в периферической крови больных КРР. Достоверных корреляционных связей не обнаружено.

На сегодняшний день известно, что нести на своей поверхности эктонуклеотидазы CD39 и CD73 могут не только Т-лимфоциты, но и нейтрофилы, составляющие большинство в периферической крови, а также В-клетки, моноциты и эндотелиальные клетки [22, 25]. РНК для анализа экспрессии в нашей работе выделяли из цельной крови. Возможно, для определения взаимосвязи между исследуемыми показателями требуется проведение более глубокой оценки с использованием в качестве исходного материала для анализа экспрессии генов фракции мононуклеарных клеток (лимфоциты и моноциты), а также увеличение объема выборки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами, а также опубликованные данные свидетельствуют об изменении экспрессии ADK в патогенезе КРР. Обнаружена связь экспрессии длинной и короткой изоформ ADK с экспрессией *CD39* и *CD73* – эктонуклеотидаз, участвующих в генерации внеклеточного аденозина. Показана перспективная роль мРНК *ADK-L* в качестве биомаркера КРР. Однако взаимосвязь между уровнями экспрессии гена ADK, изоформ *ADK-L*, *ADK-S* и содержанием Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, в периферической крови больных КРР в данном исследовании не обнаружена. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-00013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boison D., Yegutkin G.G. // *Cancer Cell*. 2019. V. 36. № 6. P. 582–596.
2. Sek K., Mølck C., Stewart G., Kats L., Darcy P., Beavis P. // *IJMS*. 2018. V. 19. № 12. P. 3837.
3. Churov A., Zhulai G. // *Human Immunol.* 2021. V. 82. № 4. P. 270–278.
4. Thompson E.A., Powell J.D. // *Annu. Rev. Med.* 2021. V. 72. № 1. P. 331–348.
5. Horenstein A.L., Chillemi A., Zaccarello G., Bruzzone S., Quarona V., Zito A., Serra S., Malavasi F. // *OncoImmunology*. 2013. V. 2. № 9. P. e26246.
6. Park J., Gupta R.S. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 18. P. 2875–2896.
7. Bagheri S., Saboury A.A., Haertlé T. // *Internat. J. Biol. Macromolecules*. 2019. V. 141. P. 1246–1257.
8. Zhulai G., Oleinik E., Shibaev M., Ignatev K. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 3. P. 418.
9. Boison D. // *Pharmacol. Rev.* 2013. V. 65. № 3. P. 906–943.
10. Wahba A.E., Fedele D., Gebril H., AlHarfoush E., Toti K.S., Jacobson K.A., Boison D. // *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2021. V. 4. № 2. P. 680–686.
11. Xu Y., Wang Y., Yan S., Zhou Y., Yang Q., Pan Y., Zeng X., An X., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2017. V. 9. № 9. P. 1263–1278.
12. El-Kharrag R., Owen R., Boison D. // *J. Caffeine Adenosine Res.* 2019. V. 9. № 1. P. 4–11.
13. Huang J., He Y., Chen M., Du J., Li G., Li S., Liu W., Long X. // *Mol. Med. Repts.* 2015. V. 12. № 5. P. 6509–6516.
14. Giglioni S., Leoncini R., Aceto E., Chessa A., Civitelli S., Bernini A., Tanzini G., Carraro F., Pucci A., Vannoni D. // *Nucleosides. Nucleotides Nucl. Acids*. 2008. V. 27. № 6–7. P. 750–754.
15. Shamloo B., Kumar N., Owen R.H., Reemmer J., Ost J., Perkins R.S., Shen H. // *Oncotarget*. 2019. V. 10. № 68. P. 7238–7250.
16. Hajizadeh F., Masjedi A., Heydarzadeh Asl. S., Karoon Kiani F., Peydaveisi M., Ghalamfarsa G., Jadidi-Niaragh F., Sevbitov A. // *Internat. Immunopharmacol.* 2020. V. 87. P. 106853.
17. Baghbani E., Noorolyai S., Shanebandi D., Mokhtarzadeh A., Aghebati-Maleki L., Shahgoli V.K., Brunetti O., Rahmani S., Shadbad M., Baghbanzadeh M., et al. // *Life Sci.* 2021. V. 282. P. 119826.
18. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко П.Н., Олейник В.М. // *Мед. иммунол.* 2017. Вып. 19. № 1. С. 89–94.
19. Головкин А.С., Серебрякова М.К., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М., Титов В.А., Иртюга О.Б., Моисеева О.М., Кробинец И.И., Кудрявцев И.В. // *Трансляционная медицина*. 2017. Вып. 4. № 5. С. 46–60.
20. Willingham S.B., Hotson A.N., Miller R.A. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020. V. 53. P. 126–133.
21. Vannoni D., Bernini A., Carlucci F., Civitelli S., Di Pietro M.C., Leoncini R., Rosi F., Tabucchi A., Tanzini G., Marinello E. // *Med. Oncol.* 2004. V. 21. № 2. P. 187–195.
22. Luo H.Y., Shen H.Y., Perkins R.S., Wang Y.X. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 908882.
23. Antonioli L., Pacher P., Vizi E.S., Haskó G. // *Trends Mol. Med.* 2013. V. 19. № 6. P. 355–367.
24. Wu X.R., He X.S., Chen Y.F., Yuan R.X., Zeng Y., Lian L., Zou Y., Lan N., Wu X., Lan P. // *J. Surg. Oncol.* 2012. V. 106. № 2. P. 130–137.
25. Pulte E.D., Broekman M.J., Olson K.E., Drosopoulos J.H.F., Kizer J.R., Islam N., Marcus A.J. // *Thrombosis Res.* 2007. V. 121. № 3. P. 309–317.