ISSN 1728-2918

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

2014
4

MOLEKULIARNAIA MEDITSINA

www.rusvrach.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА (Molekuliarnaia Meditsina)
Научно-практический журнал

Основан в 2003 г.
Выходит 6 раз в год

СОДЕРЖАНИЕ

4/2014

Н.Е. Кушлинский (юбилей) 3

ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

Мазуренко Н.Н., Кушлинский Н.Е.
Молекулярно-генетические маркеры немелкоклеточного рака легкого 4

ОБЗОР

Чухловин А.Б., Тотолян Арег А.
Биологические аспекты гиперплазии миометрия:
роль клинически значимых генных вариантов 14

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чесноков М.С., Лазаревич Н.Л.
Повышение злокачественного потенциала клеток протоковой аденокарциномы
поджелудочной железы человека при подавлении синтеза ядерного рецептора hnf4α 22

Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Ошкина Е.В., Воротников И.К., Кушлинский Н.Е.
Фосфорилированная киназа akt1, фактор роста
эндотелия сосудов и его рецепторы: внутриопухолевое содержание
и прогностическое значение у больных раком молочной железы 27

Любимова Н.В., Кожарская Г.В., Тимофеев Ю.С., Портной С.М.
С-концевой телопептид коллагена 1-го типа –
фактор прогноза поражения скелета у больных раком молочной железы 31

Кулинич Т.М., Болдырев А.Н., В.К. Боженко В.К.
Исследование противоопухолевой активности химерного пептида p16_antp *in vivo* 36

**Бабкина И.В., Тимофеев Ю.С., Тен Е.А.,
Рогожин Д.В., Соловьев Ю.Н., Руссо Е.Ю., Кадагидзе З.Г.**
Интерлейкин 16 в сыворотке крови больных с новообразованиями костей 40

Немцова М.В., Удилова А.А., Залетаев Д.В., Хоробрых Т.В.
Полиморфизмы гена *TYMS* у больных раком желудка,
связь с отдаленными результатами комбинированного лечения 44

**Герштейн Е.С., Исаева Э.Р., Кушлинский Д.Н.,
Короткова Е.А., Ермилова В.Д., Лактионов К.П., Адамян Л.В.**
Инсулиноподобные факторы роста (ИФР) и ИФР-связывающие белки
в сыворотке крови и опухолях больных с новообразованиями яичников 52

**Зенит-Журавлева Е.Г., Лушникова А.А., Понкратова Д.А., Цыганова И.В., Михайлова И.Н.,
Черемушкин Е.А., Вихрова А.С., Трещалина Е.М., Демидов Л.В., Мазуренко Н.Н.**
Некоторые генетические особенности метастатической меланомы кожи человека 57

НОВОСТИ НАУКИ 21, 35, 51

Решением Президиума ВАК журнал «Молекулярная медицина» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации **ПИ №ФС77-50064** от **04.06.12**
Редакция не имеет возможности возвращать рукописи
За содержание рекламных материалов редакция ответственности не несет
Тираж 200 экз.

Редактор **Г.А. Суворова**
Корректор **Л.В. Чучвера**
Верстка **Р.Р. Саргсян**
Компьютерный набор **Е.А. Козловская**

Выход в свет 04.08.14.
Формат 60×90/8.
Заказ 927-7-14
Цена свободная

Отпечатано в ООО «Ай-клуб», 119146, Москва,
Комсомольский пр., д. 28

Адрес редакции и издателя:
119048, Москва, ул. Усачева, 11, корп. 17 (1-й этаж)

E-mail: belushkina@rambler.ru
E-mail: verstka@rusvrach.ru
Секретариат: 8-499-246-84-02
Отдел подписки: 8-499-246-79-83
Web-site: www.molmed.rusvrach.ru
www.rusvrach.ru

Подписной индекс по каталогу Роспечать 82141

Учредитель и издатель Издательский дом «Русский врач»
Генеральный директор Г.С. Зольникова

Главный редактор
М.А. Пальцев,
академик РАН, Москва, Россия

Редколлегия журнала

ответственный секретарь
Н.Н. Белушкина д.б.н., профессор, Москва, Россия
К.В. Анохин чл.-корр. РАН, Москва, Россия
А.В. Васильев д.б.н., профессор, Москва, Россия
О.А. Голубничная профессор, Бонн, Германия
А.И. Григорьев академик РАН, Москва, Россия
А.Д. Дурнев чл.-корр. РАН, Москва, Россия
А.В. Караулов чл.-корр. РАН, Москва, Россия
И.М. Кветной д.м.н., профессор, С.-Петербург, Россия
В.И. Киселев чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Л.С. Коков чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Н.Е. Кушлинский чл.-корр. РАН, Москва, Россия
С.В. Нетесов чл.-корр. РАН, Новосибирск, Россия
Е.М. Пальцева д.м.н., Москва, Россия
В.О. Полякова д.б.н., профессор, С.-Петербург, Россия
В.О. Попов чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Д.Ф. Свааб профессор, Амстердам, Нидерланды
Е.С. Северин чл.-корр. РАН, Москва, Россия
С.Е. Северин чл.-корр. РАН, Москва, Россия
Д.А. Сычев д.м.н., профессор, Москва, Россия
Ж.-П. Тиммерманс профессор, Антверпен, Бельгия

Редакционный совет

А.И. Арчаков академик РАН, Москва, Россия
В.А. Быков академик РАН, Москва, Россия
А.Н. Коновалов академик РАН, Москва, Россия
В.П. Скулачев академик РАН, Москва, Россия
В.Н. Смирнов академик РАН, Москва, Россия
В.А. Ткачук академик РАН, Москва, Россия
А.А. Тотолян чл.-корр. РАН, С.-Петербург, Россия
Р.М. Хаитов академик РАН, Москва, Россия
Н.А. Яицкий академик РАН, С.-Петербург, Россия

MOLECULAR MEDICINE
Scientific journal

Founded in 2003 year
Published 6 times a year

CONTENT

4/2014

N.E. Kushlinskii (anniversary) 3

EDITORIAL

Mazurenko N.N., Kushlinskii N.E.
Molecular genetic markers of non-small cell lung cancer 4

REVIEWS

Chukhlovin A.B., Totolian Areg A.
Biological aspects of myometrial hyperplasia:
the possible role of clinically significant gene variants 14

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Chesnokov M.S., Lazarevich N.L.
Increase in the malignant properties of human pancreatic ductal
adenocarcinoma cells due to repression of HNF4α nuclear receptor synthesis 22

Scherbakov A.M., Gershtein E.S., Oshkina E.V., Vorotnikov I.K., Kushlinskii N.E.
The phosphorylated Akt1 kinase, vascular endothelial growth factor and its receptors:
intratumoral content and prognostic significance in breast cancer patients 27

Lyubimova N.V., Kozharskaya G.V., Timofeev Yu.S., Portnoy S.M.
C-terminal telopeptide of type I collagene –
prognostic factor of skeletal metastases in breast cancer patients 31

Kulinich T.M., Boldyrev A.N., Bozhenko V.K.
Research of antineoplastic activity of chimeric peptide p16_ANTP *in vivo* 36

Babkina I.V., Timofeev Yu.S., Ten E.A.,
Rogozin D.V., Soloviev Yu.N., Russo E.Yu., Kadagidze Z.G.
Interleukin 16 in the serum bone tumor patients 40

Nemtsova M.V., Udilova A.A., Zaletaev D.V., Khorobrych T.V.
TYMS gene polymorphisms in patients with gastric cancer,
the relationship with long-term results of combined treatment 44

Gershtein E.S., Isaeva E.R., Kushlinsky D.N.,
Korotkova E.A., Ermilova V.D., Laktionov K.P., Adamyan L.V.
Insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins
in blood serum and tumors of ovarian tumor patients 52

Zenit-Zhuravleva E.G., Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Tsyganova I.V., Mikhailova I.N.,
Cheremushkin E.A., Vikhrova A.S., Treschalina E.M., Demidov L.V., Mazurenko N.N.
Several genetic features of human metastatic cutaneous melanoma 57

SCIENCE NEWS 21, 35, 51

On Decision of the Presidium of HAC the Journal «Molecular Medicine» is included in the list of master/peer-reviewed/ scientific journals and publications, in which the main results of theses for the degree of doctor and candidate of sciences should be published

Indexed in Russian Research Citing Index

The journal was registered by the Press Committee of the Russian Federation under №ФС77-50064 on June 04, 2012. Reproduction of materials elsewhere or duplication of the materials published in the journal, in whole or in part, is not permitted without the written consent of the Russkiy Vrach (Russian Physician) Publishing House. The editors have no opportunityof returning manuscripts. The editors provide no warrantyas to the contents of advertisements
Circulation 200 copies

Editor G.A. Suvorova
Proof-reader L.V. Chuchvera
Maker-up R.R. Sargsyan
Computerized compositor Ye.A. Kozlovskaya

Signed for publication 04.08.14.
Format 60×90/8.
Order 927-7-14

Printed at the «I-Club» printing-house: 28, Komsomolsky prospect, Moscow, 119146

Address of the editorial office and publisher
119048, Moscow, 11, Usacheva St., corp. 17 (1st floor)

E-mail: belushkina@rambler.ru
E-mail: verstka@rusvrach.ru
Secretariat: 8-499-246-84-02
Subscription department: 8-499-246-79-83
Web-site: www.molmed.rusvrach.ru
www.rusvrach.ru

Rospechat catalogue subscription index 82141

Publishing House «Russkiy Vrach»
General Director G.S. Zolnikova

Editor-in-Chief
M.A. Paltsev,
PhD, MD, Acad. RAS, Moscow, Russia

Editorial board

Executive secretary
Natalia N. Belushkina PhD, D.Sci. (Biol), Prof., Moscow, Russia
Konstantin V. Anokhin PhD, MD, Corr. Memb. of RAS, Moscow, Russia
Andrei V. Vasilev PhD, D.Sci. (Biol), Prof., Moscow, Russia
Olga A. Golubnitschaja PhD, MD, Prof., Bonn, Germany
Anatolii I. Grigorev PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Andrei D. Durnev PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. of RAS, Moscow, Russia
Alexandr V.Karaulov PhD, MD.Sci.,Corr. Memb. of RAS, Moscow, Russia
Igor M. Kvetnoy PhD, MD, Prof., Saint-Petersburg, Russia
Vsevolod I. Kiselev PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. of RAS, Moscow, Russia
Leonid S. Kokov PhD, MD,Corr. Memb. of RAS, Moscow, Russia
Nikolai E. Kushlinsky PhD, MD, Corr. Memb.of RAS, Moscow, Russia
Sergei V. Netesov PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. of RAS, Novosibirsk, Russia
Ekaterina M. Paltseva PhD, MD, Moscow, Russia
Viktoriya O. Polyakova PhD, D.Sci. (Biol), Prof., Saint-Petersburg, Russia
Vladimir O. Popov PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. RAS, Moscow, Russia
Evgenii S. Severin PhD, D.Sci. (Biol), Corr. Memb. RAS, Moscow, Russia
Sergei E. Severin PhD, D.Sci. (Chem), Corr. Memb. RAS, Moscow, Russia
Dmitrii A. Sychev PhD, D.Sci. (Biol), Moscow, Russia
Dick F. Swaab PhD, MD, Prof., Amsterdam, the Netherlands
Jean-Pierre Timmermans PhD, Prof., Antwerpen, Belgium

Editorial committee

Alexander I. Archakov PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Valerii A. Bykov PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Alexander N. Konovalov PhD, D.Sci. (Med), Acad. RAS, Moscow, Russia
Vladimir P. Skulachev PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Vladimir N. Smirnov PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Vsevolod A. Tkachuk PhD, D.Sci. (Biol), Acad. RAS, Moscow, Russia
Areg A. Totolyan PhD, D.Sci.(Med), Corr. Memb. RAS, Saint-Petersburg, Russia
Rakhim M. Khaitov PhD, D.Sci. (Med), Acad. RAS, Moscow, Russia
Nikolai A. Yaitsky PhD, D.Sci. (Med), Acad. RAS, Saint-Petersburg, Russia

КУШЛИНСКИЙ НИКОЛАЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

31 августа 2014 г. исполняется 60 лет видному отечественному биохимику, члену-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору, лауреату Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники **Николаю Евгеньевичу Кушлинскому**.

В 1977 г. Н.Е. Кушлинский окончил лечебный факультет Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова и начал работать в лаборатории клинической биохимии Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР (сегодня – РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН), где прошел путь от клинического ординатора до руководителя лаборатории (1992). Параллельно он проходит клиническую ординатуру (1977–1979), затем – аспирантуру (1980–1982).

Научной работой Н.Е. Кушлинский стал заниматься еще в ординатуре. Интерес к научным исследованиям в области клинической онкологии и способность к кропотливой методической работе позволили ему защитить в 1982 г. кандидатскую диссертацию, посвященную исследованию особенностей гормональной регуляции опухолей предстательной железы, на стыке 2 специальностей – онкологии и эндокринологии. Дальнейшие научные разработки в области клинической онкоэндокринологии легли в основу его докторской диссертации (1992) и стали научным направлением, изучению которого Николай Евгеньевич уделяет пристальное внимание. Интерес к гормонально-метаболическим нарушениям при первичных опухолях костей стал основой цикла работ, выполненных под его руководством, и в 1994 г. Н.Е. Кушлинский получает ученое звание профессора по специальности «Онкология».

Под руководством Н.Е. Кушлинского небольшая прежде лаборатория клинической биохимии превратилась в одну из ведущих научно-производственных структур, оснащенную самым современным оборудованием, обеспечивающим полноценное биохимическое обследование больных с различными типами опухолей. Проводимые здесь научные исследования способствовали разработке алгоритмов, включающих около 200 биохимических показателей разного профиля и призванных повысить точность диагностики, мониторинга, оценки эффективности лечения и прогноза злокачественных новообразований. Приоритетные научные разработки Н.Е. Кушлинского и коллектива, направленные на расширение возможностей лабораторной диагностики, внедрены в клиническую практику не только РОНЦ, но и других медицинских учреждений Москвы и России. Высокий методический уровень и широкий диапазон биохимических и эндокринологических исследований лаборатории позволяют проводить совместные исследования с ведущими научно-исследовательскими институтами и онкологическими центрами России с целью разработки эффективных методов диагностики и лечения широкого спектра злокачественных новообразований.

Н.Е. Кушлинский активно занимается учебно-методической работой. Под его руководством в 2003 г. создана кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики в Московском медико-стоматологическом университете им. И.А. Евдокимова, где проводятся циклы тематического усовершенствования для врачей всех специальностей, первичная профессиональная переподготовка, сертификационные циклы по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» для высшего и среднего медицинского персонала, а также обучение в клинической интернатуре, ординатуре, аспирантуре. Уникальность научно-производственной базы кафедры и высокая квалификация ее специалистов позволили создать программу, вызывающую большой профессиональный интерес у специалистов по клинической лабораторной диагностике.

Влияние и поддержка Н.Е. Кушлинского способствовали профессиональному и научному росту сотрудников лаборатории. Под его руководством за годы работы в РОНЦ им. Н.Н. Блохина создана собственная школа биохимиков-онкологов, защищено 55 кандидатских и 26 докторских диссертаций.

Николай Евгеньевич – ответственный секретарь редколлегии журнала «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», член редколлегий журналов «Детская онкология», «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии», «Молекулярная медицина», «Патогенез».

Н.Е. Кушлинский – лауреат премий Московского городского (1983) и Центрального комитета ВЛКСМ (1987), а также премии Президиума РАМН в области фундаментальных медицинских исследований, которой отмечена его работа «Гормоны и аутопаракринные регуляторы опухолевого роста при остеогенной саркоме» (1998). В 1999 г. ему присуждено звание лауреата Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники за разработку и внедрение в клиническую практику комбинированных методов лечения остеогенной саркомы.

В 1999 г. Н.Е. Кушлинский избран членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук. Он – автор более чем 500 научных работ, опубликованных в отечественной и зарубежной печати, среди которых 10 монографий, а также руководства, справочники, методические и учебные пособия.

Коллеги и ученики Николая Евгеньевича отмечают его высокий профессионализм, эрудицию, требовательность и доброжелательность.

Редколлегия журнала от всей души поздравляет юбиляра и желает всегда оставаться таким же творческим, энергичным и успешным человеком!

Редколлегия журнала «Молекулярная медицина»

© **Н.Н. Мазуренко, Н.Е. Кушлинский**, 2014
УДК 616.24-006.6-092:577.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Н.Н. Мазуренко, доктор биологических наук, профессор,
Н.Е. Кушлинский, член-корреспондент РАН, профессор
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115476, Москва, Каширское шоссе, д. 24
E-mail: nnmazurenko@mail.ru

Рак легкого (РЛ) является самым распространенным онкологическим заболеванием в мире и наиболее частой причиной смерти от злокачественных новообразований. Исследования последнего десятилетия выявили значительное число молекулярных событий, приводящих к возникновению и развитию немелкоклеточного РЛ (НМРЛ). Идентифицированы молекулярные профили различных гистологических типов НМРЛ у курильщиков и никогда не куривших людей, включающие дифференциальную экспрессию генов и их мутантный статус. При аденокарциноме легкого наибольшее клиническое значение имеет активация онкогенов EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, HER2, C-MET, PI3K, MEK1 за счет мутаций и генов EML4-ALK, ROS1, RET за счет транслокаций. Нарушения в этих генах рассматриваются как драйверные, запускающие канцерогенез; мутация хотя бы в одном из них найдена в 60% опухолей. Именно белковые продукты этих генов чаще всего являются мишенью для индивидуализированной таргетной терапии. EGFR – наиболее важный маркер аденокарциномы легкого, при этом частота мутаций EGFR зависит от расовой принадлежности, статуса курения и пола пациента. Наибольшее применение получили тирозинкиназные ингибиторы EGFR (эрлотиниб, гефитиниб, афатиниб), EML4-ALK, c-MET, ROS1 (кризитиниб) у пациентов с мутациями указанных генов. Гены, вовлеченные в канцерогенез плоскоклеточного РЛ, изучены в меньшей степени, наибольшее клиническое значение может иметь активация генов FGFR1, PI3K, DDR2, SOX. Число потенциальных мишеней для терапии постоянно растет в связи с развитием технологий, что открывает новые механизмы канцерогенеза. В будущем изучение молекулярно-генетических маркеров позволит проводить эффективную индивидуализированную терапию пациентов с различными типами РЛ.

Ключевые слова: *немелкоклеточный рак легкого, молекулярно-генетические маркеры*

MOLECULAR GENETIC MARKERS OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER

N.N. Mazurenko, N.E. Kushlinskii
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478

Lung cancer is one of the most common oncologic diseases in the world and the most frequent cause of the death from malignant neoplasms. Last decade's studies revealed significant number of molecular events leading to the onset and development of non-small cell lung cancer (NSCLC). Molecular profiles of various NSCLC histological types in smokers and never smokers which include differential gene expression and mutational status were identified. In lung adenocarcinoma the activation of oncogenes EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, HER2, C-MET, PI3K, MEK1 due to gene mutations as well as EML4-ALK, ROS1, and RET due to gene translocations is of most clinical importance. Alterations in these genes are considered to be drivers triggering carcinogenesis, and mutation in the even one of them was found in 60% of the tumors. Protein products of these genes are more often the targets for the individualized targeted therapy. EGFR is the most important marker of lung adenocarcinoma, but the frequency of EGFR mutations varies depending on the ethnicity, smoking status and gender of the patient. Low molecular tyrosine kinase inhibitors specific for EGFR (erlotinib, gefitinib, afatinib) and EML4-ALK, c–MET, ROS1 (crisotinib) are the most often drugs of choice in patients with corresponding genes' mutations. Genes involved in carcinogenesis in squamous cell lung cancer are less studied, and the activation of FGFR1, PI3K, DDR2, SOX genes may be of the most clinical value. The number of potential therapeutic targets increases constantly with the development of new technologies that discloses new mechanisms of carcinogenesis. In the future the study of molecular genetic markers should allow to perform the effective individualized therapy for patients with various types of lung cancer.

Key words: *non-small cell lung cancer, molecular genetic markers*

С начала XX века рак легкого (РЛ) стал самым распространенным онкологическим заболеванием в мире: в 2008 г. заболели 1,6 млн человек, умерли – 1,4 млн [35]. У мужчин РЛ лидирует по числу заболеваний (17%) и смертей (23%) среди всех онкологических заболеваний. В США в 2011 г. зарегистрировано 221 130 новых случаев и 156 940 смертей от РЛ [56]. В России РЛ стоит на 1-м по частоте месте у мужчин и на 9-м – у женщин; в 2011 г. зарегистрировано 56 тыс. новых случаев заболевания [1].

Немелкоклеточный РЛ (НМРЛ) составляет 85% всех случаев РЛ и включает 3 основных гистологических типа: аденокарциному (30–45%), плоскоклеточный (25–40%) и крупноклеточный (5%) рак. Гистологические типы рака различаются по онкогенезу, клиническому течению и молекулярно-

генетическим характеристикам, что получило отражение в различных вариантах лекарственной терапии [15].

Известно, что 85% случаев РЛ вызываются канцерогенами табачного дыма, при этом в США 50% новых случаев возникают у бывших курильщиков [56]. Наиболее распространенная форма РЛ у курильщиков – плоскоклеточный рак. Среди пациентов с мелкоклеточным РЛ также 90% – курильщики. РЛ у некурящих составляет 25% всех случаев РЛ в мире (10–15% в западных странах) и занимает 7-е место среди причин смерти от онкологических заболеваний. Этиология, гистология и локализация РЛ различаются у курящих и некурящих пациентов [14, 19, 56]. Различается и спектр мутаций в опухолях у никогда не куривших и курильщиков [84].

В последние десятилетия в мире отмечается тенденция к росту частоты аденокарциномы легкого; в некоторых странах она становится наиболее распространенным гистологическим типом. Особенно часто аденокарцинома легкого встречается среди некурящих и женщин. Число некурящих пациентов с НМРЛ варьирует в разных странах. Так, в Юго-Восточной Азии среди больных женщин никогда не курили 50%, тогда как в Европе среди больных мужчин некурящих только 2–6% [14].

В России традиционно лидирует плоскоклеточный РЛ, что связано с курением крепкого табака и папирос без фильтра. В последнее время наблюдается снижение заболеваемости плоскоклеточным РЛ в связи с переходом на сигареты с фильтром и низким содержанием никотина. Однако растет заболеваемость аденокарциномой легкого, особенно среди женщин. За последние 5 лет смертность от РЛ у мужчин снизилась на 13%, а у женщин осталась на прежнем уровне [1].

В связи с тем, что >70% случаев НМРЛ выявляется в поздних стадиях заболевания и больные неоперабельны, лечение чаще сводится к химиотерапии. Проведение цитотоксической химиотерапии препаратами на основе производных платины, созданными в 1980–1990 гг., повысило 5-летнюю выживаемость больных РЛ до 10–15%. Однако объективный ответ наблюдается у 30–40% пациентов и медиана выживаемости составляет примерно 1 год при IIIB или IV стадии заболевания [8]. В связи с этим крайне актуальным остается создание более эффективных препаратов для лечения РЛ с использованием последних достижений молекулярной биологии.

С 2003 г. разрабатываются и внедряются противоопухолевые препараты, направленные на торможение ключевых сигнальных путей в опухолевой клетке [4, 5, 90]. Наиболее успешно развивается таргетная терапия, мишенью которой являются биомаркеры (62%) и рецепторы (31%) [21]. Эти новые, более эффективные схемы и режимы терапии НМРЛ направлены на максимальную индивидуализацию лечения пациентов [51].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ РЛ

Исследования последнего десятилетия на генетическом, транскрипционном, трансляционном и эпигенетическом уровнях выявили значительное число молекулярных событий, приводящих к возникновению и развитию рака. Идентифицированы молекулярные профили в различных гистологических типах РЛ у курильщиков и никогда не куривших людей, которые включают дифференциальную экспрессию генов и их мутантный статус.

Изучение геномной нестабильности показало, что наиболее часто при РЛ происходят амплификация хромосомных локусов 1q31, 3q25–27, 5p13–14, 8q23–24, 12q14, 14q13.3, 19q 12 и потеря локусов 3p21, 4q, 8p22, 9p21–22, 13q22, 17p12, 18q [8, 89]. Выявлены различия в хромосомных нарушениях при аденокарциноме легкого у западноевропейских и восточноазиатских больных [52], а также у пациентов с различным мутантным статусом EGFR [89].

Полноэкзомное секвенирование пациентов с НМРЛ позволило выявить 26 генов с высокой частотой мутаций, среди которых онкогены *EGFR, KRAS*, гены семейства *Eph, ERBB4, KDR, FGFR4, NTRK* и гены-супрессоры *TP53, STK11, NF1, RB1, ATM, APC* [17]. В 12% случаев аденокарциномы легкого амплифицирован локус 14q13.3, в котором находится ген *NKX2-1* или *TTF1*, кодирующий тиреоидный транскрипционный фактор TTF1, вовлеченный в дифференцировку РЛ и используемый для иммунодиагностики.

При полногеномном секвенировании ДНК 17 пациентов преимущественно с аденокарциномой легкого выявлено 3726 точечных мутаций и >90 инсерций или делеций. Выделено 54 гена с высокой частотой мутаций. Помимо указанных, идентифицированы нарушения в новых для РЛ генах: *DACH1, CFTR, RELN, ABCB5, HGF*. Для каждого пациента найдено в среднем 11 из 54 потенциальных мишеней таргетной терапии. Среди них тирозинкиназы (JAK, BRAF, PIK3CG, IGF1R, MET, RET и FGFR1), белки теплового шока, гистон деацетилазы (HDAC1, HDAC2, HDAC6, HDAC9) и др. [27].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО

Среди множества генетических и хромосомных нарушений при аденокарциноме легкого наибольшее клиническое значение имеет активация онкогенов *EGFR, KRAS, BRAF, NRAS, HER2, C-MET, PI3K, MEK1* за счет мутаций и генов *EML4-ALK, ROS1, RET* за счет транслокаций (реаранжировок) (см. таблицу). Нарушения в этих генах рассматриваются как драйверные, запускающие канцерогенез; мутация хотя бы в одном из них найдена в 60% опухолей. Именно эти гены чаще всего являются мишенью для индивидуализированной таргетной терапии РЛ. Более 90% мутаций в указанных генах являются взаимоисключающими, кроме генов *C-MET* и *PIK3CA* [44, 48].

ОСНОВНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НМРЛ

Ген	Генетическое нарушение	Локализация гена	Аденокарцинома, %	Плоскоклеточный рак, %	Источник
EGFR	Мутации	7p12	10–30	<5	[26, 28, 49]
EGFR	Амплификация	7p12			[26]
HER2	Гиперэкспрессия	17q11.2-q12, 17q21	5–9	3–5	[13, 79]
HER2	Мутация	17q11.2-q12, 17q21	2	1	[79]
MET	Амплификация	7q31.1	3–21	3–21	[39]
MET	Мутация	7q31.1	2	1	[26]
EML4-ALK	Транслокация	2p21, 2p23	2–7	1	[41, 47, 84]
ROS1	–//–	6q	2		[74]
RET	–//–	10q12.1	1–2		[42]
KRAS	Мутация	12p12.1	21	6	[43, 48, 101]
BRAF	–//–	7p34	1–3	2	[64, 99]
PI3KCA	Амплификация	3q26.3	6	33	[94]
PI3KCA	Мутация	3q26.3	3	3	[55]
PTEN	–//–	10q23.3	2	10	[37]
PTEN	Потеря	10q23.3	8–20	8–20	[13]
AKT1	Мутация	14q32.32	Очень редко	1	[32, 55]
FGFR1	Амплификация	8p12	11	25	[32, 88]
SOX2	–//–	3q26.3-q27	Очень редко	23	[33]
EphA2	Мутация	1p36	0	7	[22]
LKB1	–//–	19p13.3	23	5	[36]
DDR2	–//–	1q23.3	1	4	[3]

***EGFR* (EGFR1, erbB1)** – рецептор эпидермального фактора роста, после связывания с лигандами (EGF, TGF-α, амфирегулин, эпирегулин и др.) формирует гомо- или гетеродимеры с другими членами суперсемейства трансмембранных рецепторов тирозинкиназ EGFR [23, 46], что приводит к трансактивации и аутофосфорилированию по тирозину EGFR и к стимуляции внутриклеточных сигнальных каскадов: RAS/MAPK, PI3K/AKT и JAK/STAT, а также к активации PLC (фосфолипазы C) и SRC/FAK [48, 49, 91, 98]. Установлено, что для мутантных рецепторов предпочтительнее образование димеров с немутантными молекулами EGFR, которые всегда присутствуют в опухолевой клетке. Это не требует сложных конформационных изменений для создания донорно-акцепторного взаимодействия при аутофосфорилировании рецептора. Сигнальные пути, опосредованные семейством EGFR, важны для регулирования многих метаболических и физиологических процессов и активированы во многих эпителиальных опухолях за счет мутаций, гиперэкспрессии рецепторов, гиперактивности лигандов или кофакторов [60.

Гиперэкспрессия EGFR отмечается в 30–80% случаев НМРЛ, чаще – при плоскоклеточном РЛ, и наступает в результате амплификации гена (до 60% случаев) либо эпигенетических изменений. Клиническое значение гиперэкспрессии EGFR трудно оценить, так как в 50% случаев РЛ амплификация совпадает с мутацией гена *EGFR* [23, 83].

Таргетный препарат цетуксимаб – рекомбинантное химерное моноклональное антитело, обладает высокой специфичностью к внеклеточному домену EGFR и конкурирует с лигандами за связывание с рецептором. Цетуксимаб продемонстрировал эффективность в клинических исследованиях в сочетании со стандартной платиносодержащей химиотерапией для лечения НМРЛ при гиперэкспрессии EGFR [69].

В опухолях легкого выявлено >800 соматических мутаций в гене *EGFR*, наиболее важными из которых являются делеции либо точечные замены аминокислот в тирозинкиназном домене белка [26, 28, 49]. Мутации *EGFR* являются ранним событием в канцерогенезе и не связаны со стадией болезни и прогрессированием РЛ. В 95% случаев РЛ с мутацией *EGFR* является аденокарциномой, мутации *EGFR* также встречаются при крупноклеточном и (реже) при плоскоклеточном (1,5%) РЛ. Мутации *EGFR* выявляют в определенных субтипах аденокарциномы:

в аденокарциноме с бронхиолоальвеолярным компонентом, микропапиллярной, солидноклеточной, в карциноме *in situ*, но редко – в муцинозной аденокарциноме легкого [26]. У пациентов с аденокарциномой находят и герминальные мутации *EGFR*, которые могут быть причиной семейной аденокарциномы легкого [10, 62].

Многочисленные исследования показали, что частота мутаций *EGFR* варьирует в зависимости от расовой принадлежности, статуса курения, пола пациента. Мутации *EGFR* обнаруживают в 30% случаев РЛ в Юго-Восточной Азии и в 10% – у западноевропейцев [101]. Наиболее часто мутации *EGFR* встречаются в аденокарциноме у некурящих – они достигают 35% в западных странах [73] и 56–76% – у некурящих женщин в Юго-Восточной Азии [99, 101].

При изучении возможного участия гормонов в возникновении РЛ у женщин показано, что рецепторы эстрогенов (ER) чаще экспрессируются в опухоли больных РЛ, чем в окружающей неизмененной ткани, при этом у некурящих женщин с определенным типом аденокарциномы экспрессируется ERβ, но не ERα [2]. Такие опухоли обычно содержат мутации *EGFR* и характеризуются лучшим ответом на лечение.

Однако частота мутаций *EGFR* определяется не столько полом пациентов, сколько зависит от этнической принадлежности и статуса курения. В связи с этим активно изучают генетические особенности популяции. В частности, в интроне 1 гена *EGFR* содержатся динуклеотидные CA-повторы, число которых коррелирует с транскрипционной активностью гена *EGFR* и значительно больше у пациентов из Восточной Азии, чем у европеоидов и афроамериканцев [101].

Одним из классов таргетных препаратов, подавляющих активность рецептора *EGFR*, являются низкомолекулярные обратимые ингибиторы тирозинкиназ (ТКИ), блокирующие аденозинтрифосфат (АТФ)-связывающий домен *EGFR* и тем самым ингибирующие передачу сигнала от этого рецептора [90]. Ингибиторы *EGFR* – гефитиниб и эрлотиниб одобрены в 2003–2004 гг. как препараты 2-й и 3-й линий для лечения больных диссеминированным НМРЛ, прогрессирующим после химиотерапии препаратами платины. Ответ на лечение наблюдался только у 10% больных РЛ [10] с соматическими мутациями в тирозинкиназном домене *EGFR* [53, 63, 66].

В последующем результаты рандомизированных международных клинических исследований показали значительное преимущество гефитиниба и эрлотиниба по сравнению с комбинированной химиотерапией препаратами платины в качестве 1-й линии лечения больных аденокарциномой легкого с IIIB и IV стадиями заболевания при наличии мутации *EGFR* [93]. Эффект наблюдается независимо от линии терапии, хорошие результаты отмечены и у пациентов, не получавших химиотерапию, и после приобретения резистентности к цитостатическим препаратам. Так, эффективность лечения ТКИ у больных с мутациями *EGFR* значительно выше, чем с диким типом, как при 1-й (70,0% против 33,2%) [25], так и при 2-й линии терапии (47,4% против 28,5%) [68]. Применение гефитиниба и эрлотиниба позволило увеличить общую продолжительность жизни пациентов с метастатическим НМРЛ более чем вдвое (с 5–17 до 13–23 мес); в большинстве исследований медиана этого показателя приближается к 2,5 годам [93]. В апреле 2011 г. ASCO разработано положение о возможном назначении таргетной терапии ТКИ в качестве 1-й линии лечения только пациентам с установленным диагнозом при положительном тесте на мутации *EGFR* [40]. Таким образом, мутации *EGFR* являются предсказательным маркером терапии НМРЛ ТКИ; тестирование мутаций – обязательное условие индивидуализированной терапии.

Лучший клинический ответ на ТКИ наблюдали при наличии в опухоли «классической мутации» *EGFR* [98]: делеции в экзоне 19, включающие кодоны E747–A750 (аминокислоты ^{747}LREA^{750}), и точковые мутации L858R (реже L861R) в экзоне 21, на которые примерно в равных долях приходится 90% всех нарушений структуры тирозинкиназного домена EGFR [26, 43, 75]. Эффективность терапии ТКИ выше у пациентов с делецией в экзоне 19 (63–75%), чем с заменой в 21 (50–63%), что связано с различным ингибированием сигнальных путей [66, 101]. EGFR с классическими мутациями активны более длительное время, чем рецептор дикого типа, и предпочтительнее активируют PI3K/AKT и STAT3/STAT5 сигнальные пути, чем RAS/MAPK-каскад [48].

Редкие (минорные) мутации составляют 10% всех мутаций *EGFR*. В 1% аденокарцином с мутацией *EGFR* присутствуют инсерции в экзоне 19 *EGFR* [34], которые также обеспечивают чувствительность к ТКИ [31, 43, 99]. Помимо них, в экзоне 19 имеются делеции non-ELREA и точковые замены, при которых пациенты не отвечают на терапию ТКИ.

К минорным относят мутации в экзоне 18 G719A/C/D/S, которые составляют 3% мутаций гена *EGFR* (ответ на терапию ТКИ наблюдали в 53% случаев). Пациенты с мутациями кодона E709 в экзоне 18 устойчивы к гефитинибу [92].

Мутации в экзоне 20 гена *EGFR* (инсерции и миссенс-мутации T790M, S768I и др.) составляют до 10% всех мутаций *EGFR* в НМРЛ и вызывают устойчивость к ТКИ. Инсерции 3–12 нуклеотидов в экзоне 20 встречаются в первичных опухолях чаще, чем миссенс-мутации T790M. Мутацию T790M редко обнаруживают у пациентов до терапии ТКИ (2%), но она выявляется у 50% больных с приобретенной резистентностью к ТКИ [26, 72]. У ряда пациентов мутации в экзонах 19, 21 и T790M присутствуют одновременно в первичных опухолях, резистентных к ТКИ [39]. Потерю чувствительности к ТКИ EGFR связывают с тем, что появление мутации T790M вызывает активацию PI3K-сигнального пути [20].

У 20% больных НМРЛ вторичная резистентность к ТКИ связана с мутациями в гене *c-MET*, амплификацией *HER2*, появлением мутаций и активацией PI3K/AKT-каскада, VEGFR и IGF1R-сигнальных путей, а также с эпителиально-мезенхимальным переходом. C-MET также активирует PI3K/AKT. Важно, что ингибирование MET восстанавливает чувствительность EGFR к ТКИ.

Многочисленные ТКИ EGFR 2-го поколения создаются с целью преодоления первичной и вторичной резистентности к терапии [90, 95]. Препарат афатиниб ингибирует белки семейства EGFR, HER2/ErbB2Her2 и ErbB4. Афатиниб предложен для 1-й линии терапии РЛ с мутациями EGFR, а также как 2-я или 3-я линии терапии для пациентов с приобретенной резистентностью к эрлотинибу или гефитинибу [76]. Сорафениб – ТКИ-эффективный против VEGFR, KIT, PDGFR, увеличивал период до прогрессирования НМРЛ у пациентов с диким типом EGFR. Устойчивость к сорафенибу связана с повышенной экспрессий FGFR1, NF-κB и гипоксией [6]. Из новых препаратов наиболее перспективны дакомитиниб и CO-1686.

HER2. Ген *HER2* кодирует рецептор, который не взаимодействует с лигандом, а активируется при образовании гетеродимеров с другими членами семейства EGFR. Гиперэкспрессия *HER2* отмечена в 20% случаев РЛ, тогда как амплификация – в 2% [77]. Мутации выявлены в 1,6–4% случаев НМРЛ и представляют собой инсерции в экзоне 20 гена *HER2* [79]. Мутации вызывают устойчивость EGFR к ТКИ, которая преодолевается при лечении афатинибом, ингибирующим EGFR и *HER2* [13].

C-MET. Ген *c-MET* кодирует рецептор для фактора роста гепатоцитов, который при связывании с лигандом активирует MAPK, PI3K-AKT или STAT-сигнальные пути. Амплификация *c-MET* встречается в 3–7% случаев НМРЛ, причем у 20% пациентов появляется резистентность к гефитинибу. Экспрессия *MET* иммуногистохимически выявляется в 52% случаев плоскоклеточного РЛ и имеет прогностическое значение. Мутации *c-MET* обнаруживают у 2–5% больных НМРЛ. Мутации встречаются в экзонах 2, 13, 14, 18 *c-MET*, чаще кодирующих примембранный (экзон 13) и киназный (экзон 18) домены рецептора [39].

При РЛ выявлена герминальная мутация *c-MET* N375S, которая чаще встречается у выходцев из Азии (13%), чем у европеоидов, и не обнаружена у афроамериканских пациентов. Чаще мутация выявляется у курящих мужчин при плоскоклеточном раке, чем при аденокарциноме или крупноклеточном раке. Эта мутация обеспечивает устойчивость к ингибиторам MET [45].

Ряд ТКИ *c-MET* – таких, как кризотиниб (ингибирует c-MET и ALK), кабозантиниб (ингибирует *c-MET* и VEGFR2), тивантиниб и моноклональные антитела MetMab – успешно прошли клинические испытания. Их использование в комбинации с эрлотинибом дает лучшие результаты, чем только эрлотиниб. Применение сочетания кризотиниба и афатиниба для блокирования мутантного EGFR и MET позволяет надеяться на позитивные результаты по преодолению устойчивости EGFR к ТКИ [59].

ALK. Ген *ALK* кодирует анапластическую лимфомную киназу – трансмембранный тирозинкиназный рецептор, который в норме экспрессируется только в тонкой кишке, головном мозге и гонадах, но не в ткани легких. В 2007 г. при НМРЛ обнаружен слитный белок *EML4-ALK*, образующийся в результате внутрихромосомной перестройки на коротком плече хромосомы 2 (2p21-2p23), где расположены гены EML4 и ALK [81]. Известно 13 вариантов белка EML4-ALK, которые включают различные по длине участки белка EML4 (экзоны 1–13) и внутриклеточный тирозинкиназный домен рецептора ALK (экзоны 20–29 гена *ALK*). В результате образуются димерные формы слитного белка EML4-ALK с очень высокой киназной активностью, которые обнаруживаются в цитоплазме опухолевой клетки. Для пациентов со слитным геном EML4-ALK характерны определенные клинические и гистологические особенности: это более молодые больные (моложе 55 лет), чаще мужчины, некурящие пациенты с аденокарциномой легкого, преимущественно солидной или ацинарной структуры, содержащей в 75% случаев перстневидные клетки [47].

Частота транслокаций *EML4-ALK* в НМРЛ составляет 2–7%. Подсчитано, что в мире ежегодно эта транслокация встречается более чем у 60 тыс. из 1,4 млн заболевших НМРЛ. Обычно эти аденокарциномы содержат *EGFR* и *KRAS* дикого типа, однако бывают исключения [84]. Частота перестроек у некурящих больных с НМРЛ составляет 13–20%, однако у более молодых некурящих пациентов при отсутствии мутаций *EGFR* частота *EML4-ALK* возрастает с 19 до 31% [41].

Слитные EML4-ALK-киназы при РЛ не уникальны: в <1% аденокарцином выявлены слитные *ALK*-киназы KIF5B-ALK, TGF-ALK [63] и KLC1-ALK [87].

Тирозинкиназный ингибитор *c-MET* кризотиниб оказался высокоэффективным ингибитором EML4-ALK [47] и в 2011 г. утвержден Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения НМРЛ с транслокацией *ALK*. При сравнении кризотиниба с химиотерапией (пеметрекседом или доцетакселом) период до прогрессирования увеличивается с 3 до 7,7 мес, а эффект терапии значительно повышается [78]. Общая выживаемость пациентов с НМРЛ при лечении кризотинибом составляет 74% в течение 1 года и 54% – в течение 2 лет.

Приобретенная устойчивость к кризотинибу возникает в результате появления вторичных мутаций в ALK-киназном домене [11], либо вследствие мутаций *EGFR*, *KRAS* или увеличения числа копий гена *EML4-ALK* (>4 копий гена на клетку в 40% клеток в опухоли) [18]. Поиски новых ингибиторов показали, что опу-

холи с вторичными мутациям и ALK чувствительны к ингибиторам Hsp90 [12].

ROS1. Транслокация гена *ROS1* присутствует в НМРЛ в 2% случаев в виде 3 вариантов слитных продуктов ROS1-CD74, ROS1-SLC34A2 и ROS1-FIG. Пациенты с реаранжировкой *ROS1* имеют характеристики, схожие с таковыми при НМРЛ с мутациями *EGFR* или *ALK*; – это пациенты с аденокарциномой легкого, более молодого возраста, некурящие, чаще азиатского происхождения. Показана чувствительность аденокарциномы с реаранжировкой *ROS1* к лечению кризотинибом [74].

RET. Ген *RET* кодирует рецепторную тирозинкиназу, которая активирована при папиллярном и медуллярном раке щитовидной железы. Активирующие реаранжировки *RET* обнаружены в 1–2% случаев аденокарциномы легкого и выявляются при слиянии экзонов 12–20 гена *RET*, кодирующих тирозинкиназный домен, с геном *KIF5B*, который находится на расстоянии 10Mb на хромосоме 10 от *RET* и кодирует белок, участвующий в движении органелл [42]. Подобно *ALK* и *ROS1*, реаранжировки *RET* находят у некурящих пациентов с аденокарциномой. При наличии генов дикого типа *EGFR, KRAS, ALK, HER2, BRAF* или *ROS1* реаранжировки *KIF5B-RET* были выявлены в 6,3% случаев. Известно несколько мультикиназных ингибиторов киназы RET, которые эффективны против KIF5B-RET *in vitro* [51].

НАРУШЕНИЯ RAS/BRAF/MEK1/2-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ

RAS. При РЛ независимо от мутантного статуса EGFR часто происходит активация RAS/MAPK-пути за счет мутации гена *KRAS*. 90% мутаций *KRAS* затрагивают экзон 2 (кодоны G12 и G13), менее распространены мутации в экзоне 3 (Q61). Мутации *KRAS* чаще встречаются в аденокарциноме у европеоидов (15–35%), чем у пациентов из Восточной Азии (0–17%) и редко – при плоскоклеточном РЛ [43, 48, 101]. Мутации *KRAS* превалируют у мужчин и курящих пациентов (26%), чем у некурящих (6%), что связано с экспозицией к табачному дыму и развитием хромосомной нестабильности [62, 84].

Мутации *KRAS* являются маркером негативного прогноза при различных онкологических заболеваниях, но прогностическое значение мутации *KRAS* при РЛ неясно [50]. Некоторые авторы считают мутации KRAS независимым неблагоприятным прогностическим фактором (p=0,008) при НМРЛ [7]. Мутации *KRAS* ассоциированы с более коротким выживанием (26 мес) после полной резекции аденокарциномы I–III стадии, чем мутации *EGFR* (46,7 мес; p=0,0271) [82].

Прогностическое значение мутации *KRAS* зависит от типа нуклеотидной замены. У некурящих пациентов чаще представлены транзиции G>A (замена пурина на пурин в мутациях Gly12Asp или Gly13Asp), тогда как у курящих в 80% случаев выявляются трансверсии G>T/C (замена пурина на пиримидин в мутациях Gly12Cys и Gly12Val), что вызвано канцерогенами табачного дыма [70]. Общая выживаемость больных НМРЛ с трансверсиями в *KRAS* ниже, чем с транзициями. Мутантные молекулы KRAS с различными заменами активируют разные сигнальные пути. KRAS дикого типа активирует MEK, а также AKT и RalA/B. Мутация Gly12Asp активирует PI3K и MEK-сигнальные пути, тогда как Gly12Cys – преимущественно RalA/B и не может активировать PI3K [38].

Мутации *KRAS* не препятствуют действию ингибиторов EGFR гефитиниба и эрлотиниба, но снижают эффективность терапии. С другой стороны, поскольку мутации *EGFR* и *KRAS* взаимоисключающие, наличие мутации *KRAS* является маркером резистентности опухоли легкого к ТКИ [14, 43, 67]. Применение сорафениба, слабого ингибитора серинтреониновых киназ RAF, для ингибирования KRAS-сигнального пути оказалось малоэффективным [70].

NRAS. Мутации *NRAS* выявляют при НМРЛ в 1% случаев, преимущественно в аденокарциноме (83%), чаще у когда-либо куривших пациентов (95%), независимо от пола. Трансверсии в *NRAS* встречаются значительно реже, чем в *KRAS*. Наличие мутации NRAS предполагает потенциальную возможность таргетной терапии ингибиторами MEK (MAPK), находящегося ниже в цепи передачи митогенного сигнала [61].

BRAF. *BRAF* кодирует серинтреониновую киназу и активирует MAPK-сигнальный каскад. Активирующие мутации *BRAF* встречаются в 2,6–3% опухолей при НМРЛ, почти всегда – в аденокарциноме с диким типом *EGFR* и *KRAS*, чаще в опухолях у пожилых пациентов [35]. Мутации локализуются в экзонах 15 и 11 гена *BRAF*, причем мутация V600E чаще встречается у некурящих женщин, тогда как у курящих пациентов выявляются другие мутации BRAF [64]. Хотя для ингибирования BRAF с мутацией V600E при меланоме успешно применяют вемурофениб, сообщения о результатах лечения РЛ с мутацией BRAF ограничены [13]. В январе 2014 г. FDA приняло решение о присвоении статуса принципиального нового лекарственного средства препарату дабрафениб после изучения результатов II фазы клинических испытаний у больных НМРЛ с мутацией BRAF V600E, прошедших курс химиотерапии дабрафенибом.

MEK1 ***(MAP2K1)*** – серинтреониновая киназа, участвует в передаче сигнала от BRAF к ERK1и ERK2 в RAS/MAPK-сигнальном каскаде. Мутация K57N MEK1 обнаружена в 1% аденокарцином легкого с диким типом генов *EGFR, KRAS, HER2, PIK3CA, BRAF*. Мутация MEK ведет к постоянной активации ERK1 и ERK2 в культурах опухолевых клеток. Подавление MEK1 существенно уменьшает ангиогенез [39]. MEK1 является регулятором фосфатазы PTEN и контролирует накопление PI3K и сигналинг AKT. Ингибирование MEK1 подавляет связывание PTEN с

мембраной и его функционирование и таким образом стабилизирует активацию AKT [102].

MEK1 – очень перспективная модель для таргетной терапии [24]. Создано несколько ингибиторов *MEK1*: препараты траметиниб и селуметиниб прошли клинические испытания для терапии новообразований с активацией NRAS (меланомы) или *MEK1*. Малый тирозинкиназный ингибитор AZD6244, исследуется в клинических испытаниях, препарат *MEK162* также предлагается для лечения метастатической меланомы с мутацией NRAS. Возможно применение ингибиторов *MEK* (при отсутствии эффекта) в сочетании с другими ингибиторами, например ALK [48].

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РЛ

Изучение фосфорилирования по тирозину выявило многочисленные нарушения и активацию различных сигнальных путей при плоскоклеточном РЛ [71]. Однако о молекулярно-генетических маркерах плоскоклеточного РЛ, которые могут являться мишенью таргетной терапии, известно гораздо меньше, чем о маркерах аденокарциномы легкого.

При плоскоклеточном раке амплицированы гены *EGFR, EGFR3, FGFR1, PI3KCA, SOX2*, редко амплифицированы *PDGFRA/KIT* и *BRF2*. Для плоскоклеточного РЛ характерны мутации в генах *TP53, DDR2, ErhA2, NFE2L2, KEAP1, BAI3, FBXW7, GRM8, MUC16, RUNX1T1, STK11* и *ERBB4*. Изменения хотя бы в 1 из 3 генов в PI3K/AKT-пути (*PIK3CA, PTEN* или AKT3) найдены в 47% случаев плоскоклеточного рака. Изменения в передаче сигнала от рецепторов, включая амплификацию *EGFR*, мутации *BRAF* и амплификацию либо мутацию *FGFR*, выявляют в 26% случаев плоскоклеточного РЛ [9].

Амплификация гена *EGFR* и гиперэкспрессия EGFR при плоскоклеточном раке выше (82%), чем при аденокарциноме легкого (44%). Однако мутации *EGFR* при плоскоклеточном раке встречаются редко (1,5%), обычно они не типичны для аденокарциномы легкого, например L861G [9]. В то же время мутации *EGFR, KRAS, BRAF, HER2* и *ALK* выявляют в плоскоклеточном раке с минорным железистым компонентом [65].

НАРУШЕНИЯ PI3K/AKT/MTOR-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ

PIK3CA. PI3K/AKT/mTOR-путь участвует в передаче сигнала от рецепторных тирозинкиназ EGFR, HER2, IGFIR, VEGFR, KIT, PDGFR и вовлечен в регуляцию пролиферации, выживания, адгезии и подвижности клеток [97]. Активация PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути происходит при мутации либо амплификации гена *PIK3CA* (кодирует каталитическую субъединицу p110α PI3K), активации *AKT* или потере функции *PTEN*. Мутации *PIK3CA* возможны одновременно с мутациями *EGFR* или генов RAS/MAPK-пути.

PI3K/AKT/mTOR-сигнальный путь активирован в 50–70% случаев НМРЛ и при мелкоклеточном РЛ [94]. Амплификация и мутации гена PIK3CA ведут к усилению киназной активности PIK3CA и сигналинга PI3K/AKT. Ген *PIK3CA* амплифицирован преимущественно при плоскоклеточном РЛ (43%) [55]. Частота мутаций *PIK3CA* при РЛ составляет 3%, их находят в 1,5% случаев аденокарциномы и в 6–9% – при плоскоклеточном РЛ. Мутации локализованы в экзонах 9 и 20 *PIK3CA*, кодирующих соответственно спиральный и киназный домены белка. Активация сигнального пути PI3K/AKT вследствие мутации *PIK3CA* в культуре клеток РЛ с мутацией *EGFR* снимает эффект апоптоза, вызванный гефитинибом [20]. Мутации *PIK3CA* обнаруживают в 5% опухолей с приобретенной устойчивостью EGFR к ТКИ. Большое число ингибиторов PI3K проходят клинические испытания при РЛ: BKM120, BYL719, AZD5363, SAR256212 и SAR245409 [55]. Создаются также двойные ингибиторы PI3K и mTOR – PI-103 и VS-5584, при этом лучший ответ отмечен в опухолях с мутацией *PIK3CA* [30].

PTEN. Ген *PTEN* кодирует фосфатазу, которая дефосфорилирует PIP3 и тем самым негативно регулирует PI3K/AKT, вызывая опухолевую супрессию. Мутация R233 в 7 экзоне *PTEN* приводит к стоп-кодону и нарушению трансляции, что обусловливает активацию PI3K/AKT/mTOR и выживание клеток. Снижение экспрессии белка *PTEN* иммуногистохимически определяют в 75% случаев НМРЛ [13]. Известно, что в опухолях происходят и эпигенетические нарушения экспрессии PTEN. Мутации *PTEN* находят в 4–8% случаев НМРЛ, чаще при плоскоклеточном РЛ (10%), чем при аденокарциноме (1,7–7%) [37]. Мутации встречаются одновременно с мутациями в *EGFR, c-MET* и *LKB1*, но не *KRAS, BRAF* и *PI3K* [3]. Потеря PTEN может вызвать устойчивость к эрлотинибу при РЛ с мутацией *EGFR*, но, с другой стороны, потеря PTEN повышает чувствительность к ингибиторам PI3K/AKT и mTOR вследствие усиления активности киназы S6 [55].

AKT. Протоонкоген *AKT*, гомолог онкогена *v-AKT* вируса мышиной тимомы, кодирует класс серинтреониновых киназ, которые участвуют в передаче сигнала от PI3K к mTOR и вовлечены в процессы пролиферации, ангиогенеза и выживания клеток. Мутация E17K вызывает постоянную активацию AKT1, мутации AKT1 чаще находят при мелкоклеточном РЛ и только в 0,5–2% случаев НМРЛ [32, 55]. Экспрессия фосфорилированного AKT является прогностическим маркером на ранних стадиях НМРЛ [96].

LKB1 (STK11). Мутации *LKB1* часто выявляют при НМРЛ. В норме LKB1-киназа активирует AMPK (5' АМФ-активированную протеинкиназу), и потеря функции LKB1 вследствие мутации (точечные замены или делеции) ведет к подавлению AMPK и активации mTOR. Поэтому *LKB1* считают геном-супрессором. Нарушения *LKB1* проявляются

на ранних стадиях канцерогенеза, низкий уровень LKB1 белка обнаруживают при предраковых диспластических поражениях легкого. Мутации *LKB1* выявляют в 34% случаев аденокарциномы и 19% – при плоскоклеточном РЛ. Мутации *LKB1* чаще встречаются у европеоидов, чем у пациентов из Восточной Азии [36]. Инактивация LKB1 и мутация KRAS усиливают рост опухоли и метастазирование в экспериментах *in vitro*. В культурах клеток с мутантным LKB1 повышена активность IGFR1, а инактивация mTOR-пути усиливает IGFR1-сигналинг. В связи с этим ингибирование IGFR1 может быть мишенью в LKB1-мутантных опухолях [55].

FGFR1. Ген *FGFR1* кодирует рецептор фактора роста фибробластов, который входит в семейство рецепторных тирозинкиназ FGFR. Активация FGFR влияет на рост, выживание, миграцию и ангиогенез клеток. Ген *FGFR1* амплифицирован в 3–11% случаев аденокарцином, в 20–24% случаев плоскоклеточного и 25% – крупноклеточного РЛ [32, 88]. Мутации *FGFR1* встречаются редко, в основном у курильщиков [3]. FGFR1 является фактором прогноза для пациентов с плоскоклеточным и крупноклеточным РЛ: у пациентов с гиперэкспрессией FGFR1 отмечена тенденция к лучшей выживаемости и значительно уменьшен риск смерти (p=0,02) [88]. В 40% случаев РЛ с амплификацией *FGFR1* наблюдается повышенная экспрессия MYC; такие опухоли лучше отвечают на терапию ТКИ [54]. Мультитаргетные пан-FGFR ТКИ эффективны против FGFR1, среди них – понатиниб, ниндетаниб, бриваниб, довитиниб, PD173074, NVP-BGJ398 и др. [17, 55].

SOX2. SOX2-белок (SRY-box 2) – транскрипционный фактор, регулятор нормальных стволовых клеток, играет важную роль в развитии эпителия легких, участвует в передаче сигнала SOX/TP63/NOTCH. *SOX2* амплифицирован в 20% случаев плоскоклеточного РЛ независимо от уровня дифференцировки [33]. Иммуногистохимически гиперэкспрессия SOX2 выявляется при плоскоклеточном раке (91%), аденокарциноме (21%) и нейроэндокринных опухолях (72%). Однако активации SOX2 недостаточно для трансформации; необходима активация других «драйверных генов». В большинстве случаев плоскоклеточного рака наблюдали ассоциацию экспрессии SOX2 и p63 [80]. Выключение SOX2 путем РНК-интерференции подавляет пролиферацию клеток более эффективно, чем выключение PI3KCA или p63. Разработка таргетных препаратов против SOX2 пока не проводится [55].

EphA. Ген *EphA2* входит в семейство генов *Eph* (erythropoietin-producing hepatocellular), кодирующих тирозинкиназные рецепторы эритропоэтина, которые важны в эмбриогенезе для развития сосудов и тканей. Гиперэкспрессия EphA2 в НМРЛ ассоциирована с клеточной подвижностью, инвазией, метастазированием и ангиогенезом; она имеет прогностическое значение: коррелирует с курением и худшим выживанием, метастазированием. Мутация *EphA2* (G391R) выявлена в 7% случаев плоскоклеточного рака (у 2 из 28 больных), но отсутствует в аденокарциноме или при крупноклеточном РЛ, вызывает активацию mTOR [22]. Гиперэкспрессия EphA2 ведет к фосфорилированию SRC, контактина и каспазы p130 и усиливает клеточную инвазию, что особенно выражено при мутации G391R. Мультитаргетный ТКИ десатиниб подавляет Bcr-Abl, KIT, SRC, эффективен против EphA2. Разрабатываются также новые, более специфичные препараты.

DDR2. Ген *DDR2* кодирует тирозинкиназный рецептор, который связывает коллаген и вызывает миграцию клеток, пролиферацию и выживание. Передача сигнала от DDR2 включает SRC, STAT и MAPK-сигнальные пути. Мутации DDR2 выявляют в 3,8% плоскоклеточного РЛ, миссенс-мутации локализуются в различных доменах DDR2. Наиболее важна замена S768R в киназном домене; мутации M117V в экзоне 6 и K680L в 11 экзоне выявлены только у курильщиков с плоскоклеточным РЛ [3]. Ингибирование DDR2 десатинибом и РНК-интерференцией подавляет пролиферацию клеток РЛ [29]. У пациентов с НМРЛ применяют монотерапию десатинибом либо в комбинации с эрлотинибом [55].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение молекулярно-генетических нарушений при РЛ позволяет определить молекулярные маркеры, характерные для различных гистологических типов заболевания, и разработать новые молекулярно-нацеленные (таргетные) препараты, ингибирующие действие активированных онкогенов и сигнальных путей. Однако сегодня известны «драйверные гены» только для 50–60% случаев НМРЛ. Число потенциальных мишеней для терапии постоянно растет в связи с развитием технологий, что открывает новые механизмы канцерогенеза. Несомненно, все большее значение будет иметь индивидуализированная терапия НМРЛ, при этом молекулярная диагностика становится основой выбора лечебной тактики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010г. Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. 2012; 22 (3). (прил. 1): 54–61.
(Davidov M.I. , Axel E.M. Statistiks of malignant tumors in Russia and UIC in 2010. Vestnick N.N. Blokhin RCRC 2012; 22 (3). (Adit. 1): 54–61 (in Russian))
2. Ali G., Donati V., Loggini B. et al. Different estrogen receptor beta expression in distinct histologic subtypes of lung adenocarcinoma. Hum Pathol. 2008; 39 (10): 1465–73.
3. An S.-J., Chen Z.-H., Su J. et al. Identification of Enriched Driver Gene Alterations in Subgroups of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Based on Histology and Smoking Status. PLoS One. 2012; 7 (6): e40109.
4. Antonicelli A., Cafarotti S., IndiniA. et al. EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on EGFR Oncogenic Mutation. Int. J. Med. Sci. 2013; 10 (3): 320–30.
5. Blackhall F.H., Rehman S., Thatcher N. Erlotinib in non-small cell lung cancer: a

review. Expert Opin. Pharmacother. 2005; 6: 995–1002.
6. Blumenschein G.R.Jr, Saintigny P., Liu S. et al. Comprehensive Biomarker Analysis and Final Efficacy Results of Sorafenib in the BATTLE. Trial. Clin. Cancer Res. 2013; 19 (24): 6967–75.
7. Bonanno L., Schiavon M., Nardo G. et al. Prognostic and predictive implications of EGFR mutations, EGFR copy number and KRAS mutations in advanced stage lung adenocarcinoma. Anticancer Res. 2010; 30 (12): 5121–8.
8. Broët F., Dalmasso C., Tan E.H. et al. Genomic Profiles Specific to Patient Ethnicity in Lung Adenocarcinoma. Clin. Cancer Res. 2011; 17 (11): 3542–50.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. Nature. 2012; 489: 519–25.
10. Centeno I., Blay P., Santamaria I. et al. Germ-line mutations in epidermal growth factor receptor (EGFR) are rare but may contribute to oncogenesis: a novel germ-line mutation in EGFR detected in a patient with lung adenocarcinoma. BMC Cancer. 2011. May 16; 11: 172. doi: 10.1186/1471-2407-11-172.
11. Choi Y.L., Soda M., Yamashita Y. et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. N. Engl. J. Med. 2010; 363 (18): 1734–9.
12. Chen Z., Akbay E.A., Mikse O.R. et al. Co-clinical trials demonstrate superiority of crizotinib to chemotherapy in ALK-rearranged non-small cell lung cancer and predict strategies to overcome resistance. Clin. Cancer Res. 2014; 20 (5): 1204–11.
13. Cooper W.A., Lam D.C.L., O'Toole S.A., Minna J.D. Molecular biology of lung cancer. J. Thorac. Dis. 2013; 5 (S5): 479–90.
14. Couraud S., Zaicman G., Milleron B. et al. Lung cancer in never smokers – A review. Eur. J. Cancer. 2012; 48 (9): 1299–311.
15. Davidson M.R., Gazdar A.F., Clarke B.E. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. J. Thorac. Dis. 2013; 5 (Suppl. 5): 463–78.
16. Ding L., Getz G., Wheeler D.A. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature. 2008; 455 (7216): 1069–75.
17. Dutt A., Ramos A.H., Hammerman P.S. et al. Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. PLoS One. 2011;6(6):e20351. doi: 10.1371/journal.pone.0020351
18. Doebele R.C., Pilling A.B., Aisner D.L. et al. Mechanisms of Resistance to Crizotinib in Patients with ALK Gene Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. Clin. Cancer Res. 2012; 18 (5): 1472–82.
19. El-Telbany A., Ma P.C. Cancer Genes in Lung Cancer. Genes Cancer. 2012; 3 (7–8): 467–80.
20. Engelman J.A., Mukohara T., Zeinullahu K. et al. Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. J. Clin. Invest. 2006; 116 (10): 2695–706.
21. Falconi A., Lopes G., Parker J.L. Biomarkers and receptor targeted therapies reduce clinical trial risk in non-small-cell lung cancer. J. Thorac. Oncol. 2014; 9 (2): 163–9.
22. Faoro L., Singleton P.A., Cervantes G.M. et al. EphA2 mutation in lung squamous cell cancer promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesion, and mammalian target of rapamycin activation. J. Biol. Chem. 2010; 285: 18575–85.
23. Ferguson K.M. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. Annu. Rev. Biophys. 2008; 37: 353–73.
24. Frémin C., Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. J Hematol Oncol. 2010 Feb 11;3:8. doi: 10.1186/1756-8722-3-8.
25. Fukuoka M., Wu Y.L., Thongprasert S. et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). J. Clin. Oncol. 2011; 29: 2866–74.
26. Gazdar A.F. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: The evolving role of individualized therapy. Cancer Metast. Rev. 2010; 29: 37–48.
27. Govindan R., Li Ding L., Griffith M. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never smokers. Cell. 2012; 150 (6): 1121–34.
28. Gu D., Scaringe W.A., Li K. et al. Database of somatic mutations in EFGR with analyses revealing Indel hotspots but no smoking associated signature. Hum. Mutation. 2007; 28 (8): 760–70.
29. Hammerman P.S., Sos M.L., Ramos A.H. et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. Cancer Discov. 2011; 1 (1): 78–89.
30. Hart S., Novotny-Diermayr V., Goh K.C. VS-5584, a Novel and Highly Selective PI3K/mTOR Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer. Mol. Cancer Ther. 2013; 12 (2): 151–61.
31. He M., Capelletti M., Nafa K. et al. EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. Clin. Cancer Res. 2012; 18 (6): 1790–7.
32. Heist R.S., Kenudson M.M., Sequist L.V. et al. FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung. J. Thorac. Oncol. 2012; 7 (12): 1775–80.
33. Hussenet T., Dali S., Exinger J. et al. SOX2 Is an Oncogene Activated by Recurrent 3q26.3 Amplifications in Human Lung Squamous Cell Carcinomas. PLoS One. 2010; 5 (1): e8960.
34. Jackman D.M., Miller V.A., Cioffredi.A. et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. Clin. Cancer Res. 2009; 15 (16): 5267–73.
35. Jernal A., Bray F., Center M.M. et al. Global cancer statistics. CA J. Clin. 2011; 61 (2): 69–90.
36. Ji H., Ramsey M.R., Hayes D.N. et al. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. Nature. 2007; 448 (7155): 807–10.
37. Jin G., Kim M.J., Jeon H.S. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. Lung Cancer. 2010; 69 (3): 279–83.
38. Ihle N.T., Byers L.A., Kim E.S. et al. Effect of KRAS Oncogene Substitutions on Protein Behavior: Implications for Signaling and Clinical Outcome. J. Natl. Cancer. Inst. 2012; 104 (3): 228–39.
39. Johnson J.L., Pillai S., Chellappan S.P. Genetic and Biochemical Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. Bioch. Res. Intern. 2012, Article ID 940405, 18 pages.
40. Keedy V.L., Temin S., Somerfield M.R. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 2121–7.
41. Kobayashi M., Sakakibara T., Inoue A. et al. An effective enrichment strategy for EML4-ALK fusion gene screening in patients with non-small cell lung cancer. Respir. Investig. 2014; 52 (1): 49–56.
42. Kohno T., Ichikawa H., Totoki Y. et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat. Med. 2012; 18: 375–7.
43. Kosaka T., Yatabe Y., Endoh H. et al. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications. Cancer Res. 2004; 64: 8919–23.
44. Kris M.G., Johnson B.E., Kwiatkowski D.J. et al. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1000 patients with lung adenocarcinoma: The NCI's lung cancer mutation consortium (LCMC). J. Clin. Oncol. 2011; 29 (Suppl): abstr CRA7506.)
45. Krishnaswamy S., Kanteti R., Duke-Cohan J.S. et al. Ethnic Differences and Functional Analysis of MET Mutations in Lung Cancer. Clin. Cancer Res. 2009; 15 (18): 5714–23.
46. Kumar A., Petri E.T., Halmos B., Boggon T.J. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. J. Clin. Oncol. 2008; 26: 1742–51.
47. Kwak E.L., Bang Y.J., Camidge D.R. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N. Eng. J. Med. 2010; 363: 1693–703.
48. Larsen J.E., Minna J.D. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. Clin. Chest. Med. 2011; 32 (4): 703–40.
49. Laurent-Puig P., Lievre A., Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. Clin. Cancer Res. 2009; 15 (4): 1133–9.
50. Li A.R., Chitale D., Riely G.J. et al. EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. J. Mol. Diagn. 2008; 10 (3): 242–8.
51. Lipson D., Capelletti M., Yelensky R. et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. Nat. Med. 2012; 18: 382–4.
52. Lo F.Y., Chang J.W., Shou I. et al. The database of chromosome imbalance regions and genes resided in lung cancer from Asian and Caucasian identified by array-comparative genomic hybridization. BMC Cancer. 2012; 12: 235.
53. Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N. Engl. J. Med. 2004; 350: 2129–39.
54. Malchers F., Dietlein F., Schöttle J. et al. Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms of Transformation by Amplified FGFR1 in Lung Cancer. Cancer Discovery. 2014; 4 (2): 246–57.
55. Mantripragada K., Khurshid H. Targeting genomic alterations in squamous cell

lung cancer. Front Oncol. 2013; 3: Article 195: 1–9.
56. McCarthy W.J., Meza R., Jeon J., Moolgavkar S. Lung cancer in never smokers Epidemiology and risk prediction models. Risk Anal. 2012; 32 (Suppl. 1): 69–84.
57. Mitsudomi T. Advances in target therapy for lung cancer. Jpn. J. Clin. Oncol. 2010; 40: 101–6.
58. Mok T.S. Personalized medicine in lung cancer: What we need to know. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011; 8: 661–8.
59. Nanjo S., Yamada T., Nishihara H. Ability of the Met Kinase Inhibitor Crizotinib and New Generation EGFR Inhibitors to Overcome Resistance to EGFR Inhibitors. PLoS One. 2013; 8 (12): e84700.
60. Normanno N., De Luca A., Bianco C. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene. 2006; 366 (1): 2–16.
61. Ohashi K., Sequist L.V., Arcila M.E. Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. Clin. Cancer Res. 2013; 19 (9): 2584–91.
62. Ohtsuka K., Ohnishi H., Kurai D. et al. Familial lung adenocarcinoma caused by the EGFR V843I germ-line mutation. J. Clin. Oncol. 2011; 29 (8): 191–2.
63. Paez J.G., Janne P.A., Lee J.C. et al. Egfr mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. 2004; 304: 1497–500.
64. Paik P.K., Arcila M.E., Fara M. et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. J. Clin. Oncol. 2011; 29 (15): 2046–51.
65. Pan Y., Wang R., Ye T. et al. Comprehensive Analysis of Oncogenic Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma with Minor Glandular Component. Chest. 2013; Oct 24. doi: 10.1378/chest. 12–2679.
66. Pao W., Miller V., Zakowski M. et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancer from «never smokers» and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. PNAS. 2004; 101 (36): 13306–11.
67. Pao W., Wang T.Y., Riely G.J. et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. PLOS medicine 2005; 2 (1): e17, 0057–0061.
68. Petrelli F., Borgonovo K., Cabiddu M., Barni S. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of 13 randomized trials. Clin. Lung Cancer. 2012; 13: 107–14.
69. Pirker R., Pereira J.R., Szczesna A. et al. FLEX Study Team. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. Lancet. 2009; 373 (9674): 1525–31.
70. Riely G.J., Kris M.G., Rosenbaum D. et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. Clin. Cancer Res. 2008; 14: 5731–4.
71. Rikova K., Guo A., Zeng Q. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell. 2007; 131: 1190–203.
72. Rossel R., Taron M., Reguart N. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Activation: How Exon 19 and 21 Mutations Changed our Understanding of the Pathway. Clin. Cancer Res. 2006; 12 (240): 7222–31.
73. Rosell R., Moran T., Queralt C. et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N. Engl. J. Med. 2009; 361: 958–67.
74. Rothschild S.I., Gautschi O. Crizotinib in the treatment of non-small cell lung cancer. Clin. Lung Cancer. 2013; 14: 473–80, 1–90.
75. Sequist L.V., Joshi V.A., Jänne P.A. Response to Treatment and Survival of Patients with Non-Small Cell LungCancer Undergoing Somatic EGFR Mutation Testing. Oncologist. 2007; 12: 90–8.
76. Sequist L.V., Yang J.C., Yamamoto N. et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J. Clin. Oncol. 2013; 31 (27): 3327–34.
77. Sharma S.V., Settleman J. Erbbs in lung cancer. Exper. Cell Res. 2009; 315: 557–71.
78. Shaw A.T., Kim D.W., Nakagawa K. et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. N. Engl. J. Med. 2013; 368 (25): 2385–94.
79. Shigematsu H., Takahashi T., Nomura M. et al. Somatic Mutations of the HER2 Kinase Domain in Lung Adenocarcinomas. Cancer Res. 2005; 65: (5) 1642–6.
80. Sholl L.M., Long K.B., Hornick J.L. Sox2 expression in pulmonary non-small cell and neuroendocrine carcinomas. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2010; 18 (1): 55–61.
81. Soda M., Choi Y.L., Enomoto M. et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer. Nature. 2007; 448: 561–6.
82. Sonobe M., Kobayashi M., Ishikawa M. et al. Impact of KRAS and EGFR Gene Mutations on Recurrence and Survival in Patients with Surgically Resected Lung Adenocarcinomas. Ann. Surg. Oncol. 2011; 19 Suppl 3: 347–54. doi: 10.1245/s10434-011-1799-8.
83. Suzuki M., Shigematsu H., Hiroshima K. et al. Epidermal growth factor receptor expression status in lung cancer correlates with its mutation. Hum. Pathol. 2005; 36: 1127–34.
84. Takahashi T., Sonobe M., Kobayashi M. et. al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. Ann. Surg. Oncol. 2010; 17: 889–97.
85. Takamochi K., Oh S., Suzuki K. Differences in EGFR and KRAS mutation spectra in lung adenocarcinoma of never and heavy smokers. Oncol. Lett. 2013; 6 (5): 1207–12.
86. Takeuchi K., Soda M., Togashi Y. et al. «RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer», Nature Medicine. 2012; 18 (3): 378–81.
87. Togashi Y., Soda M., Sakata S. et al. KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. PLoS ONE, 2012; 7 (2): Article ID e31323.
88. Tran T.N., Selinger C.I., Kohonen-Corish M.R. et al. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2013; 81 (3): 462–7.
89. Weir B.A., Woo M.S., Getz G. et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. Nature. 2007; 450: 893–8.
90. Wheeler D.L., Dunn E.F., Harari P.M. Understanding resistance to EgFR inhibitors—impact on future treatment strategies Nat. Rev. Clin. Oncol. 2010; 7: 493–507.
91. West L., Vidwans J.S., Campbell N.P. et al. A Novel Classification of Lung Cancer into Molecular Subtypes. PLoS ONE, 2012; 7 (2): Article ID e31906.
92. Wu J.Y., Yu C.J., Chang Y.C. et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on «uncommon» epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 2011; 17 (11): 3812–21.
93. Wu K., House L., Liu W., Cho W.C.S. Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer. Int. J. Mol. Sci. 2012; 13: 11471–96.
94. Yamamoto H., Shigematsu H., Nomura M. et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. Cancer Res. 2008; 68: 6913–21.
95. Yang S.-H. Molecular Basis of Drug Resistance: Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors. Tuberc. Respir. Dis. (Seoul). 2013; 75 (5): 188–98.
96. Yip P.Y., Cooper W.A., Kohonen-Corish M.R. et al. Phosphorylated Akt expression is a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. J. Clin. Pathol. 2013; 21. doi: 10.1136.
97. Yuan T.L., Cantley L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene. 2008; 27 (41): 5497–510.
98. Zhang Z., Stiegler A.L., Boggon T.J. et al. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. Oncotarget. 2010; 1 (7): 497–514.
99. Zhang Y., Sun Y., Pan Y. et al. Frequency of driver mutations in lung adenocarcinoma from female never-smokers varies with histological subtypes and age at diagnosis. Clin. Cancer Res. 2012; 18 (7): 1947–53.
100. Zhu J.Q., Zhong W.Z., Zhang G.C. Better survival with EGFR exon 19 than exon 21 mutations in gefitinib-treated non-small cell lung cancer patients is due to differential inhibition of downstream signals. Cancer Lett. 2008; 265 (2): 307–17.
101. Zhou W., Christiani D.C. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. Clin. J. Cancer. 2011; 30 (5): 287–92.
102. Zmajkovicova K., Jesenberger V., Catalanotti F. et al. EK1 Is Required for PTEN Membrane Recruitment, AKT Regulation, and the Maintenance of Peripheral Tolerance. Mol. Cell. 2013; 50 (1): 43–55.

Поступила 29 мая 2014 г.

© **А.Б. Чухловин, Арег А. Тотолян**, 2014
УДК 618.141-006.363-092:612.6.05]-07

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГИПЕРПЛАЗИИ МИОМЕТРИЯ: РОЛЬ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ГЕННЫХ ВАРИАНТОВ

А.Б. Чухловин[1, 3], доктор медицинских наук, профессор,
Арег А. Тотолян[2, 3], член-корреспондент РАН, профессор

[1]Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Российская Федерация, 197089, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8;
[2]НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14;
[3]Федеральный исследовательский медицинский центр им. В.А. Алмазова, Российская Федерация, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

E-mail: alexei.chukh@mail.ru

Представлен анализ биологических механизмов влияния функциональных генных вариантов на частоту возникновения и клиническое течение лейомиомы (ЛМ) и других гиперпластических заболеваний матки. На основании репрезентативных исследований по оценке частоты ряда функциональных аллельных вариантов при ЛМ, проведенных в различных этнических группах, осуществлен поиск наиболее значимых в патогенетическом плане генов, влияющих на частоту возникновения и клинические проявления данного социально значимого заболевания. При обследовании различных популяций изучены возможные модулирующие эффекты полиморфных генов-регуляторов синтеза и деградации стероидных гормонов, рецепторов эстрогенов и андрогенов, генов цитокинов и матриксных металлопротеиназ в отношении риска развития ЛМ, темпа и фокальности роста. В целом функциональные варианты генов рецепторов эстрогенов, прогестерона, матриксных металлопротеиназ могут существенно влиять на риски развития ЛМ и характер ее течения. Однако клинические эффекты этих генов различаются для отдельных этнических групп, что ограничивает их предиктивную ценность.

Ключевые слова: *лейомиома матки, генный полиморфизм, рецепторы эстрогенов, цитокины, матриксные металлопротеиназы*

BIOLOGICAL ASPECTS OF MYOMETRIAL HYPERPLASIA: THE POSSIBLE ROLE OF CLINICALLY SIGNIFICANT GENE VARIANTS

A.B. Chukhlovin[1, 3], Areg A.Totolian[2, 3]

[1]First I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University, L'va Tolstogo Str., 6/8, St. Petersburg, Russian Federation, 197089;
[2]St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Mira Str., 14, St. Petersburg, Russian Federation, 197101;
[3]V.A. Almazov Federal Research Medical Center, Akkuratova Str., 2, St. Petersburg, Russian Federation, 197341

The aim of our review article was to analyze different biological effects associated with functional allelic variants of certain genes upon the incidence and clinical course of uterine leiomyoma (UL) and some other hyperplastic uterine disorders. Based on a number of representative studies devoted to the assessment the frequency of a set of functional allelic variants in LM cases there was performed the search for the most sound in the pathogenetical view genes influencing on the prevalence and clinical manifestations of this socially significant disease. When studying different female populations, we have yielded data on possible modulating effects of polymorphic genes-regulators controlling synthesis and degradation of steroid hormones, and also estrogen, androgen and progesterone receptors, cytokine genes and matrix metalloproteinases upon the relative risk of the development of UL, its rate of the growth and focality. In general, functional variants of estrogen and progesterone receptor genes, as well as those of matrix metalloproteinases may sufficiently influence the risks of UL evolution and the character of its clinical course. However, clinical effects of these genes differ for various ethnic groups, thus limiting their general predictive value.

Key words: *uterine leiomyoma, gene polymorphism, estrogen receptors, cytokines, matrix metalloproteinases*

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, лейомиома – ЛМ (фибромиома) матки развивается у 15–40% женщин репродуктивного возраста, являясь, таким образом, распространенным социально значимым заболеванием. В постменопаузальном периоде эта доброкачественная опухоль обычно стабилизируется в объеме и часто претерпевает инволюцию, что также служит доказательством ее гормонозависимости [1].

Механизмы опухолевого роста миометрия до сих пор точно не установлены. Однако весьма убедительна гипотеза о связи роста ЛМ с месячным эндокринным циклом. Общеизвестно, что в фолликулярной фазе цикла возрастают уровень эстрогенов (Е) и гиперплазия эндометрия, а затем в лютеиновой фазе происходят выработка прогестерона (Pg) и созревание яйцеклетки. Мелкие сосуды (спиральные артерии), питающие эндометрий и миометрий, чув-

ствительны к E и Pg. В начале менструации на фоне падения уровня стероидных гормонов возникает локальная ишемия обширных участков матки из-за сужения спиральных артерий и артериол, после чего происходят гибель и отслоение эндо- и миометрия с массивными кровотечениями. При этом в большом количестве выделяются факторы свертывания крови, что ведет к локальному тромбозу и снижает объем кровопотери. Одновременно в этих зонах происходит выработка провоспалительных цитокинов и тканеспецифических факторов роста, что способствует скорой регенерации эндометрия [2]. Таким образом, в патофизиологическом плане этот процесс аналогичен посттравматической регенерации тканей. Указанные циклические события сопровождаются у многих женщин постепенной фокальной пролиферацией миометрия (развитием ЛМ) и(или) эктопическим ростом эндометрия (аденомиозом).

По современным представлениям, каждый очаг роста ЛМ развивается из 1 клеточного клона. Об этом свидетельствуют данные [3], которые определяли генетическую гетерогенность узлов миомы матки по набору 15 микросателлитных маркеров и показателям генетической инактивации X-хромосомы в 43 образцах опухолевых тканей, полученных от 14 пациенток. Авторы доказали, что ЛМ образуется из единичной клетки-предшественника, но дочерние очаги роста в ткани матки развиваются независимо друг от друга. Утрата гетерозиготности по хромосоме 7p22-15 может быть дополнительным фактором развития ЛМ.

МЕХАНИЗМЫ ГИПЕРПЛАЗИИ ЭНДО- И МИОМЕТРИЯ ПРИ МИОМЕ МАТКИ

Атрофия и последующая регенерация любой ткани, в том числе клеточных структур матки, сопровождается перестройкой и ремоделированием ее соединительнотканных структур, а также ростом новых сосудистых структур (неоангиогенез). Биологический смысл перестройки внеклеточного матрикса состоит в пролиферации фибробластов и увеличении объема внеклеточного матрикса. По мере регенерации происходит восстановление нормальных тканей. Тем не менее у многих женщин возникает избыточная регенерация тканей матки – фокальное разрастание гладкомышечных структур со значительной примесью соединительнотканных элементов и формированием очагов клонального роста миометрия. На фоне этого цикличного процесса с годами может развиться ЛМ матки.

Таким образом, основными факторами развития ЛМ матки следует считать:

1) гормоночувствительность тканей миометрия;
2) циклическое повреждение и ремоделирование эндо- и миометрия,
3) периодическое стимулирующее воздействие E и факторов роста на рост миометрия;
4) клональность роста ЛМ, ведущего к формированию очагов опухолевого роста.

Перечисленные этапы роста очагов ЛМ запускаются под влиянием стероидных гормонов и осуществляются при участии соответствующих рецепторных молекул. Так, общеизвестно, что эффекты E, андрогенов и Pg реализуются через специфические ядерные и цитоплазматические рецепторы (соответственно ER, AR и PgR). Показано, что в ткани ЛМ повышена экспрессия мРНК генов-рецепторов эстрогенов и Pg [4]. Местная воспалительная реакция реализуется при активации системы интерлейкинов (IL) и хемокинов. При ЛМ показаны активация генов, кодирующих эти белковые молекулы, и повышение их продукции, выявлено достоверное повышение уровня IL10, гранулоцитарно-макрофагальный фактор роста (*GMCSF*), интерферона-γ (IFNγ) и фактора некроза опухоли-α (TNFα) у пациенток с длительным течением заболевания [5]. Отмечались также изменения в содержании у больных B-лимфоцитов, ассоциированные с увеличением количества миоматозных узлов [6].

Исследования экспрессии генов хемокинов показали разнонаправленные изменения MIP-1, CCR3, CCR5, IL8 и эотаксина в ткани ЛМ по сравнению с окружающим миометрием [7]. Аналогичным образом достоверное повышение уровня мРНК MIP-1α, эотаксина-2 и снижение экспрессии мРНК CCR-3 обнаружено в случаях полипоза, развивающегося на фоне гиперплазии эндометрия [8].

Кроме того, в ходе месячного цикла и при ЛМ отмечается локальная активация системы матриксных металлопротеиназ (MMP), что указывает на активные процессы ремоделирования внеклеточного матрикса миометрия [9]. Наряду с этим некоторые авторы отметили повышенную продукцию факторов роста эпителия и соединительной ткани (TGFβ, bFGF, EGF, инсулиноподобного фактора роста), что согласуется с мнением об активации соединительной ткани при ЛМ [10]. Каждый из перечисленных биологических процессов контролируется конкретными генами. Регуляция этих генов осуществляется как под влиянием патогенных воздействий на организм, так и с учетом наследственных характеристик генома данного пациента.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГЕННЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ КАК СРЕДСТВО АНАЛИЗА МЕХАНИЗМОВ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Полиморфизм генов обычно выявляют при анализе генных последовательностей в различных группах населения (например, отдельных этнических группах). Генный полиморфизм – это отклонение от дикой (условно нормальной) последовательности данного гена, т.е. замена, выпадение или вставка одного или нескольких нуклеотидов. Всего к настоящему времени зарегистрировано несколько миллионов таких полиморфных вариантов в геноме человека, ежедневно мировые базы данных (HapMap и др.) пополняются сотнями новых полиморфизмов.

Для некоторых так называемых функциональных генных вариантов доказана связь с повышенным или пониженным синтезом (активностью) соответствующего белка (энзима или рецептора). Поэтому сравнение частоты таких функциональных генных вариантов у пациентов и в контрольной группе позволяет предположить роль специфического белка в генезе данного заболевания, его клинических особенностях или ответ на специфическую лекарственную терапию. В таблице приведены опубликованные данные о ряде полиморфных генов, потенциально способных влиять на риск развития и клинические особенности ЛМ матки.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭФФЕКТОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Ген CYP17

Этот ген относится к обширной группе цитохромов P450. Он считается ключевым энзимом, синтезирующим предшественники стероидных гормонов. Можно допустить, что функциональные варианты данного гена, различающиеся по активности, могут влиять на общий гормональный фон, определяющий клиническое течение ЛМ и других гормонозависимых гиперплазий. Так, исследование, проведенное японскими учеными (в группе было 138 больных ЛМ; 179 обследованных составили популяционный контроль), касалось анализа полиморфизма *Msp1 (A1/A2)* гена *CYP17* [11]. По частоте аллелей A1, A2 и распределению генотипов не обнаружено существенных различий между ЛМ и контролем (по крайней мере, в японской популяции).

В ряде исследований показаны этнические различия в частоте генотипов *CYP17*. Авторы [12] обследовали женщин после гистерэктомии по поводу ЛМ (145 пациенток европейского происхождения и жительниц Южной Африки). У них исследовали наличие полиморфного сайта *CYP17 Msp A1/A2*. Оказалось, что риск развития ЛМ у южноафриканок с генотипом A2/A2 (более высокий уровень эстрогенов) гораздо выше, чем в других этнических группах. Это – достоверно установленный фактор, хотя он и не был ведущим при оценке риска ЛМ. У женщин европейского происхождения единственным значимым фактором развития ЛМ был прием оральных контрацептивов.

НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ, ИССЛЕДОВАННЫЕ В КАЧЕСТВЕ ФАКТОРОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА ГИПЕРПЛАЗИИ МИОМЕТРИЯ

Ген	Белковый продукт	Функция белка	Генные варианты	Минорный аллель	Биологический эффект
CYP17	17-α гидроксилаза/ 17-α лиаза	Биосинтез стероидов	Сайт рестрикции *Msp1 A1/A2* (-34T>C)	A2	Повышение уровня E
ER1	Рецептор E типа 1	Активация гормонзависимых генов	*ER1* T -397C; сайт рестрикции PvuII	C	Повышение экспрессии *ER1*
PgR	Рецептор Pg	То же	PROGINS (вставка/ делеция фрагмента гена *PgR*	Вставка 306 п.о. (аллель T2)	Снижение транскрипции гена, низкий ответ на Pg
AR	Рецептор андрогенов	–//–	Большое число повторов (CAG)n	>21 CAG-повторов	Снижение ответа на андрогены
COMT	Катехол-О-метилтрансфераза	Инактивация E	Вал188Мет	188Мет	Низкая активность COMT
IL1β	IL1β	Провоспалительный цитокин	IL1β -511 C>T	T	Снижение продукции IL1β
IL6	IL-6	То же	IL6 -174 G>C	G	Повышение транскрипции гена
TNFα	TNFα	–//–	TNFα-308 G>A	A	То же
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов	Стимуляция ангиогенеза	-460 T>C	T	Активация антиогенеза
MMP1	MMP1	Расщепление коллагена	-1607 1G>2G	2G	Повышение транскрипции гена *MMP1*
MMP3	MMP3	Расщепление коллагена и гликанов	-1171 5A/6A	5A	Повышение транскрипции гена *MMP3*
ACE	Ангиотензин-превращающий фермент	Активация ряда проэнзимов	Вставка/делеция/(I/D) в интроне 16	D	Повышение продукции ангиотензина II

В связи с возможной патогенетической ролью данного гена в генезе ЛМ представляет интерес небольшой метаанализ [13], проведенный с целью оценки клинической значимости одного из мутантных вариантов GG гена *CYP17A*, ассоциированного с повышенным уровнем эстрадиола в крови. Полученные результаты не выявили четкой ассоциации между мутантным вариантом GG гена *CYP17A1* и популяционной частотой ЛМ. В то же время отмечен повышенный риск множественных очагов ЛМ с данным вариантом гена (относительный риск – OR=3,25), главным образом для африканских женщин, среди которых преобладает этот тип роста опухоли.

Рецепторы эстрогенов

В отдельных исследованиях показана возможная роль рецепторов эстрогенов в прогрессировании ЛМ. Так, индийскими авторами [14] показано 9-кратное повышение экспрессии генов *ER1* (-397T>C) в ткани ЛМ (по сравнению с участками неизмененного миометрия). При этом обнаружено, что у женщин с генотипом *ER1* -397CC экспрессия мРНК этого гена значительно выше, чем генотипов CT и TT, т.е. гомозиготный генотип CC связан с высоким уровнем активности данного гена. Наряду с этим отмечена активация гена митохондриального цитохрома b (MTCYB), что может быть причиной усиленной пролиферации гладкомышечных клеток матки при формировании ЛМ.

Ранее итальянскими авторами [15] изучалась частота распределения генотипов полиморфных сайтов рестрикции PvuII (-397 C>T) и XbaI гена *ER1* в связи с развитием ЛМ. В исследовании участвовали 119 женщин после гистерэктомии. Анализ распределения генотипов не показал достоверных различий по этим маркерам между ЛМ и контролем в данной выборке пациенток.

Упомянутый полиморфизм -397 T>C (сайт рестрикции PvuII) гена *ER1*, по-видимому, ассоциирован с рядом эстрогензависимых заболеваний у женщин (рак молочной железы, ЛМ, эндометриоз, остеопороз). Частоту этого генного варианта проверили индийские авторы [16] у 367 женщин с эндометриозом и(или) ЛМ и в контрольной группе (115 женщин). В результате была обнаружена взаимосвязь между аллелем C этого гена и наличием ЛМ и(или) эндометриоза (OR – соответственно 2,1 и 2,7; $p<0,05$).

Американские авторы обследовали 198 женщин с ЛМ и изучили 229 контрольных образцов [17]. В пробах ДНК из немиоматозного миометрия определяли интронные варианты PvuII (T-397C) и XbaI гена *ER1*. По данным авторов, генотип PP был ассоциирован с 6-кратным риском ЛМ в общей группе женщин, особенно среди афроамериканок. Генотип *PP* был также связан с большим размером опухолей (>400 г). В опытах *in vitro* культивируемые клетки миометрия с генотипом *PP* давали более выраженный пролиферативный ответ на эстрогены. Таким образом, генотип *ER1 PP* является генетическим фактором риска ЛМ у контингента, подвергнутого хирургическому вмешательству. Преобладание этого генотипа у афроамериканок может быть причиной более частого развития у них ЛМ.

Оценка влияния полиморфизмов разных генов проводилась в европейской выборке (130 женщин с ЛМ; изучено также 139 контрольных образцов) [18]. Определяли варианты рецептора эстрогенов-α (*ER1*), *COMT* и цитохрома P450 17 (*CYP17A*), которые могли влиять на обмен эстрогенов. Определяли следующие генотипы: *ESR1 IVS1-397 T/C* (PvuII), *COMT G158A* и *CYP17A 34T/C SNPs*. При сравнении групп ЛМ и контроля не обнаружено достоверных различий в частоте аллелей и распределении генотипов для *ER1 IVS 1-397 T/C* (PvuII) соответственно *COMT G158A* и *CYP17A 34T/C*. Таким образом, носительство данных аллельных вариантов в европеоидной популяции женщин не связано с риском развития ЛМ. Наконец, недавно опубликован метаанализ, в котором изучалась роль генных вариантов рецепторов эстрогенов *ER1* как фактора риска развития ЛМ матки [19]. На основании данных 9 исследований сделан общий вывод о небольшом повышении риска ЛМ (OR=1,41) для 2 полиморфных сайтов гена *ER1* PvuII и XbaI.

Рецепторы Pg

В связи с циклическими изменениями фона стероидных гормонов у женщин в репродуктивном периоде представляет актуальность исследование полиморфизма PgR. Так, в работе [20] определялись 2 полиморфизма этого гена (*+331G/A* и *V600L*) у 270 женщин с ЛМ и 163 – в контрольной группе. Анализ клинических и генетических данных не выявил связи между частотой этих генных вариантов и риском развития ЛМ. Однако были обнаружены достоверные ассоциации между определенными аллелями *PgR* и клиническими особенностями течения ЛМ (наличием мультифокального роста, эндометриоза и др.).

Другим хорошо изученным вариантом гена *PgR* является PROGINS (генотип T2, вставка фрагмента длиной 306 п.н. в интроне 7), который считается фактором предрасположенности к раку молочной железы. Он не кодирует белок, но связан с пониженной выработкой специфической мРНК и *PgR*, поэтому клетки с вариантом PROGINS отличаются меньшей чувствительностью к эффектам прогестинов [21].

В рамках анализа роли PROGINS при доброкачественной гиперплазии у женщин обследованы 445 индийских пациенток с эндометриозом (n=100), ЛМ матки (n=80), а также контрольная группа (n=108) [22]. Частота аллеля T2 составил соответственно 5, 10 и 5,5%, т.е. различий не обнаружено.

В исследовании китайских авторов [23] проведены сравнения между группой с ЛМ (n=120), контролем (норма; n=140) и гиперпролактинемией (n=101). Генный вариант *Progins* T2 (со вставкой 306 п.н. в области Alu гена *PgR*). В китайской популяции

не обнаружено различий в частоте T1/T2 между ЛМ и контролем.

Авторы обследовали бразильских женщин в пременопаузе с ЛМ (n=122) и в постменопаузе (n=125; контроль); ДНК – из миометрия или крови [24]. PROGINS-позитивные генотипы были идентифицированы в 19% случаев среди светлокожих и в 11% – в других популяциях при частоте аллелей соответственно 10,4 и 6,2%. При сравнении показателей в основной группе и в контроле наблюдалась достоверная разница среди небелых женщин как по наличию PROGINS-аллеля (4,9% против 25%), так и по частоте PROGINS (3,3% против 12,5%). В этой группе показан пониженный риск развития ЛМ при наличии PROGINS-позитивности (OR=0,16), но не среди светлокожих пациенток (OR=0,76). Таким образом, полиморфизм PROGINS явился протективным фактором для ЛМ только среди небелых бразильских женщин.

Рецепторы андрогенов

Некоторые авторы считают, что преобладание ряда онкологических заболеваний у мужчин и женщин может быть связано с изменениями продукции рецепторов андрогенов в гормоночувствительных тканях. В связи с этим давно описан участок гена *AR* (экзон 1) с различным числом повторов CAG. В частности, более длинные участки полиглутамина, кодируемые CAG-повторами, связывают с более низкой транскрипционной активностью РА *in vitro* [25]. Число таких повторов коррелирует с уровнем продукции рецепторов андрогенов в клетках и в принципе может быть дополнительным фактором риска при гормонозависимых гиперплазиях.

Действительно, по данным обследования китайской популяции [26], у женщин с ЛМ матки число повторов $(CAG)_n$ значительно выше, чем в контрольной группе (соответственно n=23 и 21; p<0,01). У больных с мультифокальной ЛМ в среднем были наиболее протяженные участки гена *AR* (n=24; CAG-повтора). Таким образом, эта работа позволяет допустить роль данного генного полиморфизма в гормональной индукции ЛМ.

Индийские авторы [27] при изучении 140 случаев ЛМ и 90 случаев эндометриоза также показали увеличение средней протяженности полиморфного участка $(CAG)_n$ гена *AR* у больных ЛМ в отличие от больных эндометриозом и контрольной группы [27]. Однако здесь сложно сравнивать группы с ЛМ и эндометриозом вследствие частого сочетания этих состояний.

Катехол-О-метилтрансфераза

Ген катехол-О-метилтрансферазы (*COMT*) кодирует энзим, инактивирующий так называемые катехиновые эстрогены, и может оказывать протективный эффект при эстрогензависимом онкогенезе. Вариант Вал158Мет (Ex4-12 G>A; rs4680) ассоциирован с более низкой активностью фермента и, соответственно, с б льшими эффектами эстрогенов. В связи с этим группа авторов из США [28] изучала частоту данного полиморфизма в ДНК лейкоцитов у 972 женщин (576 афроамериканок и 396 светлокожих) с ЛМ. При учете соматических и социокультурных факторов было показано, что распределение генотипов COMT и частота ЛМ имеют этнические различия, однако в этой популяции не обнаружено существенных связей между наличием ЛМ и вариантами Вал158Мет *COMT*.

Этнические особенности генетических эффектов *COMT* отмечены также в работе [29]. Известно, что ЛМ в США чаще развивается у женщин африканского происхождения. В связи с этим важно было установить этнические различия в факторах метаболизма эстрогенов, к которым относится и *COMT*. Авторы определяли полиморфизм Вал158Мет у 186 женщин с ЛМ и 142 – без опухолей матки. У женщин с высокоактивным генотипом *COMT* (Вал/Вал) риск развития ЛМ был в 2,5 раза выше, чем у женщин с другими генотипами (p<0,001). Встречаемость этого генотипа у афроамериканок значительно выше, чем у женщин европеидной популяции или испанок-участниц исследования (соответственно 47; 19 и 30%; p=0,003). Клетки миометрия с генотипом *COMT* Вал/Вал значительно лучше отвечали пролиферацией *in vitro* при добавлении эстрогенов. Таким образом, высокая активность генотипа Вал/Вал гена *COMT* ассоциирована с более высоким риском развития ЛМ, что создает предпосылки для лечения ЛМ с помощью ингибиторов *COMT*.

Кроме того, данный полиморфизм гена *COMT* изучали бразильские авторы [30] у 124 женщин с ЛМ и 193 обследованных контрольной группы (женщины в постменопаузе без признаков ЛМ). Гетеро- или гомозиготную мутантную форму гораздо чаще выявляли у женщин с ЛМ, чем в контроле (соответственно 27 и 16%; p=0,006). Однако эта разница отмечена только для небелых женщин. Носительство аллеля с низкой активностью было связано с наличием у женщин больших опухолей (OR=3,3). Следовательно, мутантный вариант *COMT* сопряжен с большей степенью гиперплазии при ЛМ.

В Турции [31] обследованы 105 больных ЛМ и изучено 105 контрольных образцов с целью изучения полиморфизма гена *COMT*, Вал158Мет. Его частота одинакова в контроле и при ЛМ. Однако у больных с крупными опухолями аллель *COMT* Вал158Мет встречался чаще.

Наконец, можно обратить внимание на недавний метаанализ китайских авторов [32]. Оценка информативности Вал/58Мет полиморфизма *COMT* по ряду публикаций показала, что этот вариант ассоциирован с небольшим снижением риска ЛМ, особенно в африканской популяции (OR=0,68; 95%, доверительный интервал – ДИ – 0,48–0,97; p=0,03), что, конечно, требует дополнительных исследований.

ЦИТОКИНЫ И ФАКТОРЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Интерлейкин-1 и -6

Для оценки корреляций между вариантами гена IL1β обследована 131 пациентка основной груп-

пы и 280 – контрольной; генотипированы аллели IL1β-511 и IL1β-3954 [33]. Выявлено достоверное различие в частоте аллелей IL1β-511 C<T, т.е. частота данного полиморфизма была 70,6% (аллель C) в основной группе и 57,1% – в контрольной (OR=1,81; p<0,0002). Распределение генотипов также отражало эти различия (C/C против C/T+T/T; p<0,0002; OR=2,73), что говорит о повышенном риске развития ЛМ в связи с генными вариантами IL1β-511 и о возможном вкладе IL1 или опосредованных им процессов острой фазы воспаления в генезе ЛМ в европейской популяции.

Эти результаты расходятся с данными, полученными у китайских пациенток, у которых не обнаружено различий между больными ЛМ и контролем по генотипам IL1β-511 и IL1β-3954 [34].

Исследование промоторного полиморфизма IL6 -174 G/C проводилось в украинской популяции больных с ЛМ и в контроле [35]. Частота данных аллелей IL6 (-174G и -174C) была сходной с данными из Германии, Австрии, Нидерландов. В то же время отмечено значительное повышение по сравнению с контролем частоты аллеля C в группе пациенток с ЛМ.

Фактор некроза опухолей

Фактор некроза опухолей-α (TNFα) является ключевым фактором воспалительных процессов, белком острой фазы воспаления. В связи с этим его функциональные варианты могут играть роль фактора риска ЛМ. В частности, чешские авторы [36] в небольшой группе (102 больных с ЛМ и 145 здоровых женщин) исследовали широкий спектр полиморфизмов генов, кодирующих цитокины систем Th1 и Th2. Обнаружены различия по частоте гена *TNFA-308 A/G*. Генотип AA встречался чаще в младшей возрастной группе (≤35 лет; p=0,02). Исследование показало, что варианты генов IL4 и TNFα могут быть ассоциированы с повышенным риском ЛМ. Напротив, в выборке китайских пациенток (Тайвань) обнаружено, что носительство аллеля G данного генного полиморфизма TNFα связано с повышенной частотой ЛМ [37]. Таким образом, необходимо продолжить исследования в этом направлении в отдельных этнических группах.

Ангиотензинпревращающий фермент

Наряду с генами, влияющими на неоангиогенез, большое значение для формирования опухолевой стромы имеют факторы, регулирующие сосудистый тонус, например (ангиотензинпревращающий фермент – ACE). Его кодирует ген *ACE*, который может содержать делецию (D) или вставку (I) в интроне 16. Аллель D ассоциирован с более высоким содержанием ACE в крови. Для исследования значимости этого полиморфизма для ЛМ и аденомиоза [38] обследовали женщин с эндометриозом (n=125; 1-я группа) и ЛМ (n=120; 2-я группа); 3-ю (контрольную) группу составили 128 женщин. Соотношения генотипов II, ID и DD были следующими: в 1-й группе – 50,4; 24; 25,6%; во 2-й – 25,0; 23,3 и 51,7%; в 3-й – 10,2; 29,7 и 60,1% соответственно; соотношения аллелей I/D: в 1-й группе – 62,4 и 37,6%; во 2-й – 36,7 и 63,3%; в 3-й 25,0 и 75,0% соответственно. Сделан вывод, что полиморфизм ACE*I/D ассоциирован с повышенным риском эндометриоза и ЛМ матки.

ФАКТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА

VEGF

Фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) является стимулятором роста эндотелия и, соответственно, процесса неоангиогенеза, в том числе в развитии ЛМ матки. Исследователи из Тайваня [39] изучали роль генных вариантов -460 T>C (сайт рестрикции BstUI) гена *VEGF* у женщин с ЛМ (n=159) и без ЛМ (n=131). Соотношения генотипов *C/T* и *T/T* были следующими: 32 и 68% (ЛМ) и 63 и 37% (контроль) соответственно. Соотношения аллелей C/T – соответственно 16 и 84%, а также 32 и 68%. Авторы полагают, что наличие аллеля T является фактором патогенеза ЛМ.

Матриксные металлопротеиназы

Гормонозависимая гиперплазия тканей матки может проявляться в виде мышечно-фиброидных образований (ЛМ) или эктопического роста эндометрия (аденомиоз). В обоих этих процессах несомненна роль ремоделирования соединительной ткани, а ключевую роль играют MMP, экспрессия которых повышена в зоне роста. Соответственно, функциональные варианты MMP могут влиять на динамику роста опухоли [40]. В частности, мы обследовали 171 женщину с ЛМ (средний возраст 46,6±0,5 года); при этом определились генотипы MMP1 (-1607 1G/2G, rs1799750) и MMP3 (-1171 5A/6A, rs3025058) в ДНК лейкоцитов. Распределение генотипов не различалось между группами ЛМ и контрольной, т.е. эти полиморфизмы не влияли на встречаемость данных новообразований. В то же время различия зависели от темпа роста опухолей. У больных со стабильными опухолями частота генотипа MMP1 1G/1G была выше, чем у пациентов с прогрессирующим ростом (p=0,02 по тесту χ^2). Ускоренный рост опухоли коррелировал с большей частотой аллеля MMP1 2G (OR=2,048; p=0,039). Этот аллель с повышенной продукцией MMP1 был также ассоциирован с мультифокальным ростом (OR=3,561; p=0,01249). Кроме того, аллель MMP1 2G встречался более часто у пациенток с аденомиозом (OR=1,525; p=0,054). Таким образом, генотип 2G (-1607) MMP1 является потенциальным маркером риска гиперплазии миометрия и эндометрия.

Безусловно, представляет интерес также исследование, ранее проведенное в японской выборке [41]. Авторы определяли полиморфизмы MMP1 (-1607 1G/2G) и MMP9 (-1562 C/T) у 267 больных ЛМ и 184 обследованных группы сравнения. Распределение аллелей по частоте для MMP1 -1607 2G и MMP9 -1562 T составило соответственно 74,6 и 18,6% у больных ЛМ и 71,3 и 18,6% – в контроле. Также не установлено корреляций между генотипами и размером опухоли

или соответствующим семейным анамнезом; сделан вывод, что данные полиморфизмы, по-видимому, не имеют существенного значения для развития ЛМ у японских женщин.

Кроме того, опубликован ряд работ, касающихся функциональных вариантов генов, контролирующих репарацию ДНК, а также детоксицирующих ферментов (GSTM1, GSTP1). Этих, безусловно важных, компонентов в настоящем обзоре мы не касаемся – они подлежат отдельному анализу.

ВЫВОДЫ

1. ЛМ матки является доброкачественной опухолью и в фундаментальном аспекте служит оптимальной клинической моделью для анализа механизмов гормонозависимой клеточной пролиферации.

2. Патогенез ЛМ включает аспекты гормональной регуляции роста миометрия, воспалительных реакций и факторов ремоделирования соединительной ткани.

3. Для отдельных генов, контролирующих развитие и рост ЛМ матки, описаны аллельные варианты с различным уровнем активности, изученные в разных популяциях больных.

4. Имеющиеся в литературе сведения об ассоциациях соответствующих функциональных генных вариантов с вероятностью развития ЛМ и характеристиками ее роста свидетельствуют о том, что уровни активности специфических генов и их белковых продуктов играет значительную роль в возникновении и росте узлов ЛМ.

5. Вероятность развития ЛМ матки и прогнозирование ее течения на основании анализа функциональных генных вариантов должны учитываться отдельно для различных этнических групп ввиду неоднозначности соответствующих клинических эффектов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Khan A.T., Shehmar M., Gupta J.K. Uterine fibroids: current perspectives. Internat. J. Women's Health. 2014; 6: 95–114.
2. Stewart E.A., Nowak R.A. Leiomyoma-related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. Human Reproduction Update. 1996; 2 (4): 295–306.
3. Canevari R.A., Pontes A., Rosa F.E., Rainho C.A., Rogatto S.R. Independent clonal origin of multiple uterine leiomyomas that was determined by X chromosome inactivation and microsatellite analysis. Am. J. Obstet. Gynecol. 2005; 193 (4): 1395–403.
4. Шрамко С.В., Лещенко А.С., Хвостова Е.П., Сабанцев М.А., Баженова Л.Г., Гуляева Л.Ф. Молекулярная характеристика миомы тела матки по экспрессии генов стероидных рецепторов, STS, SULT и PTEN. Молекулярная медицина. 2013; 6: 39–43. (Shramko S.V., Leshchemko A.S., Khvostova E.P., Sabattsev M.A., Bajenova L.G., Gulyaeva L.F. Molecular characteristics of uterine leiomyoma by expression of genes encoding steroid receptors, STS, SULT, and PTEN. Molekularnaya Meditsina. 2013; 6: 39–43 (in Russian))
5. Сысоев К.А., Кулагина Н.В., Тотолян Арег А. Особенности экспрессии цитокинов в перитонеальной жидкости у больных с лейомиомой матки. Медицинская иммунология 2006; 8 (4): 547–56. (Syssoev K.A., Kulagina N.V., Totolian Areg A. Specific features of cytokine expression in peritoneal fluid from the patients with uterine leiomyoma. Medizinskaya Immunologiya. 2006; 8 (4): 547–56 (in Russian))
6. Зуева Е.Е., Кулагина Н.В., Комарова Л.С., Куртова А.В., Молчанова И.В., Алексеева Е.Ф., Тотолян Арег А. Представленность различных популяций лимфоцитов в периферической крови больных миомой матки. Медицинская иммунология. 2005; 7 (5–6): 535–42. (Zueva E.E., Kulagina N.V., Komarova L.S., Kurtova A.V., Molchanova I.V., Alexeeva E.F., Totolian Areg A. Ratios of different lymphocyte populations in peripheral blood of patients with uterine leiomyoma. Medizinskaya Immunologiya. 2005; 7 (5–6): 535–42 (in Russian))
7. Сысоев К.А., Кулагина Н.В., Чухловин А.Б., Морозова Е.Б., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в тканях миометрия и лейомиомы матки. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008; 145 (1): 91–7. (Syssoev K.A., Kulagina N.V., Chukhlovin A.B., Morozova E.B., Totolian Areg A. Expression of mRNAs for chemokines and chemokine receptors in myometrium and uterine leiomyoma. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2008; 145 (1): 91–7 (in Russian))
8. Кулагина Н.В., Чухловин А.Б., Сысоев К.А., Тотолян Арег А., Кипич Н.В. Особенности местного синтеза мРНК некоторых CC- и CXC-хемокинов и их рецепторов при гиперплазии эндометрия. Медицинская иммунология 2011; 13 (2–3): 189–96. (Kulagina N.V., Chuhklovin A.B., Syssoev K.A., Totolian Areg A., Kipich N.V. Distinct features of local mRNA synthesis for some CC- and CXC chemokines and their receptors in endometrial hyperplasia. Medizinskaya Immunulogiya. 2011; 13 (2–3): 189–96 (in Russian))
9. Curry T.E. Jr, Osteen K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. Endocr Rev. 2003; 24 (4): 428–65.
10. Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Посисеева Л.В., Анциферова Ю.С., Суворкина Е.Е., Аревадзе И.Э. Иммунологические маркеры темпа роста миомы матки. Медицинская иммунология. 2002; 4 (2): 283–4. (Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I., Posiseeva L.V., Antsyferova Yu.S., Suvorkina E.E., Arevadze I.E. Immunological markers of the uterine leiomyoma growth rates. Medizinskaya Immunologiya. 2002; 4 (2): 284–4 (in Russian))
11. Tsujino T., Ohara N., Yoshida S., Kennedy S., Takemura N., Deguchi M., Maruo T. The CYP17 MspA1 polymorphism is not associated with an increased risk of uterine leiomyomas in a Japanese population. Gynecol. Endocrinol. 2006; 22 (2): 87–91.
12. Amant F., Dorfling C.M., de Brabanter J., Vandewalle J., Vergote I., Lindeque B.G., van Rensburg E.J. A possible role of the cytochrome P450c17alpha gene (CYP17) polymorphism in the pathobiology of uterine leiomyomas from black South African women: a pilot study. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2004; 83 (3): 234–9.
13. Pakiz M., Potocnik U., But I., Mujezinovic F. A CYP17A1 gene polymorphism in association with multiple uterine leimyomas; a meta-analysis. Cancer Biomark. 2010–2011; 8 (1): 29–34.
14. Shaik N.A., Lone W.G., Khan I.A., Rao K.P., Kodati V.L., Hasan Q. Enhanced transcription of estrogen receptor α and mitochondrial cytochrome b genes in uterine leiomyomas. Gynecol. Endocrinol. 2011; 27 (12): 1094–8.
15. Massart F., Becherini L., Gennari L., Facchini V., Genazzani A.R., Brandi M.L. Genotype distribution of estrogen receptor-alpha gene polymorphisms in Italian women with surgical uterine leiomyomas. Fertil. Steril. 2001; 75 (3): 567–70.
16. Govindan S., Shaik N.A., Vedicherla B., Kodati V., Rao K.P., Hasan Q. Estrogen receptor-alpha gene (T/C) Pvu II polymorphism in endometriosis and uterine fibroids. Dis Markers. 2009; 26 (4): 149–54. doi: 10.3233/DMA-2009-0625.
17. Al-Hendy A., Salama S.A. Ethnic distribution of estrogen receptor-alpha polymorphism is associated with a higher prevalence of uterine leiomyomas in black Americans. Fertil. Steril. 2006; 86 (3): 686–93.
18. Denschlag D., Bentz E.K., Hefler L., Pietrowski D., Zeillinger R., Tempfer C., Tong D. Genotype distribution of estrogen receptor-alpha, catechol-O-methyltransferase, and cytochrome P450 17 gene polymorphisms in Caucasian women with uterine leiomyomas. Fertil. Steril. 2006; 85 (2): 462–7.
19. Feng Y., Lin X., Zhou S., Xu N., Yi T., Zhao X. The associations between the polymorphisms of the ER-α gene and the risk of uterine leiomyoma (ULM). Tumour Biol. 2013; 34 (5): 3077–82.
20. Renner S.P., Strick R., Fasching P.A., Oeser S., Oppelt P., Mueller A., Beckmann M.W., Strissel P.L. Single nucleotide polymorphisms in the progesterone receptor gene and association with uterine leiomyoma tumor characteristics and disease risk. Am. J. Obstet. Gynecol. 2008; 199 (6): 648.e1-9.
21. Romano A., Delvoux B., Fischer D.C., Groothuis P. The PROGINS polymorphism of

the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. J. Mol. Endocrinol. 2007; 38 (1–2): 331–50.
22. Govindan S., Ahmad S.N., Vedicherla B., Kodati V., Jahan P., Rao K.P., Ahuja Y.R., Hasan Q. Association of progesterone receptor gene polymorphism (PROGINS) with endometriosis, uterine fibroids and breast cancer. Cancer Biomark. 2007; 3 (2): 73–8.
23. Hsieh Y.Y., Chan I.P., Wang H.I., Chang C.C., Huang C.W., Lin C.S. PROGINS Alu sequence insertion is associated with hyperprolactinaemia but not leiomyoma susceptibility. Clin. Endocrinol. 2005; 62 (4): 492–7.
24. Gomes M.T., Castro R.A., Villanova F.E., da Silva I.D., Baracat E.C., de Lima G.R., Girão M.J. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGINS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. Fertil. Steril. 2007; 87 (5): 1116–21.
25. Adamovic T., Nordenskjöld A. The CAG repeat polymorphism in the Androgen receptor gene modifies the risk for hypospadias in Caucasians. BMC Med Genet. 2012; 13: 109. doi: 10.1186/1471-2350-13-109, PMCID: PMC3560208
26. Teng X.Y., Liu G.Q., Diao X.L., Wu Z.Y., Li L., Zhang W., Zhang X., Su Q. CAG repeats in the androgen receptor gene are shorter in patients with pulmonary, esophageal or bladder carcinoma and longer in women with uterine leiomyoma. Oncol. Rep. 2010; 23 (3): 811–8.
27. Shaik N.A., Govindan S., Kodati V., Rao K.P., Hasan Q. Polymorphic (CAG)n repeats in the androgen receptor gene: a risk marker for endometriosis and uterine leiomyomas. Hematol. Oncol. Stem. Cell Ther. 2009; 2 (1): 289–93.
28. Gooden K.M., Schroeder J.C., North K.E., Gammon M.D., Hartmann K.E., Taylor J., Baird D.D. Val153Met polymorphism of catechol-O-methyltransferase and prevalence of uterine leiomyomata. Reprod. Sci. 2007; 14 (2): 117–20.
29. Al-Hendy A., Salama S.A. Catechol-O-methyltransferase polymorphism is associated with increased uterine leiomyoma risk in different ethnic groups. J. Soc. Gynecol. Investig. 2006; 13 (2): 136–44.
30. de Oliveira E., de Aquino Castro R., Gomes M.T., da Silva I.D., Baracat E.C., de Lima G.R., Sartori M.G., Girão M.J. The catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and prevalence of uterine fibroids. Maturitas. 2008; 60 (3–4): 235–8.
31. Ates O., Demirturk F., Toprak M., Sezer S. Polymorphism of catechol-o-methyltransferase and uterine leiomyoma. Mol. Cell. Biochem. 2013; 375 (1–2): 179–83.
32. Feng Y., Zhao X., Zhou C., Yang L., Liu Y., Bian C., Gou J., Lin X., Wang Z., Zhao X. The associations between the Val158Met in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and the risk of uterine leiomyoma (ULM). Gene. 2013; 529 (2): 296–9.
33. Pietrowski D., Thewes R., Sator M., Denschlag D., Keck C., Tempfer C. Uterine leiomyoma is associated with a polymorphism in the interleukin 1-beta gene. Am. J. Reprod. Immunol. 2009; 62 (2): 112–7.
34. Hsieh Y.Y., Chang C.C., Tsai C.H., Lin C.C., Tsai F.J. Interleukin (IL)-12 receptor beta1 codon 378 G homozygote and allele, but not IL-1 (beta-511 promoter, 3953 exon 5, receptor antagonist), IL-2 114, IL-4-590 intron 3, IL-8 3'-UTR 2767, and IL-18 105, are associated with higher susceptibility to leiomyoma. Fertil. Steril. 2007; 87 (4): 886–95.
35. Litovkin K.V., Domenyuk V.P., Bubnov V.V., Zaporozhan V.N. Interleukin-6 -174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study. Exp. Oncol. 2007; 29 (4): 295–8.
36. Sosna O., Kolesár L., Slavčev A., Skibová J., Fait T., Mara M., Stříž I., Kužel D. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid. Folia Biol. (Praha). 2010; 56 (5): 206–10.
37. Hsieh Y.Y., Chang C.C., Tsai F.J., Lin C.C., Yeh L.S., Tsai C.H. Tumor necrosis factor-alpha-308 promoter and p53 codon 72 gene polymorphisms in women with leiomyomas. Fertil. Steril. 2004; 82 (3): 1177–81.
38. Hsieh Y.Y., Lee C.C., Chang C.C., Wang Y.K., Yeh L.S., Lin C.S. Angiotensin I-converting enzyme insertion-related genotypes and allele are associated with higher susceptibility of endometriosis and leiomyoma. Mol. Reprod. Dev. 2007; 74 (7): 808–14.
39. Hsieh Y.Y., Chang C.C., Tsai F.J., Lin C.C., Tsai C.H. T allele for VEGF-460 gene polymorphism at 5'-untranslated region is associated with higher susceptibility of leiomyoma. Biochem Genet. 2008; 46 (5–6): 356–61.
40. Morosova E.B., Chukhlovin A.B., Kulagina N.V., Kipich N.V., Totolian A.A. Functional gene polymorphism of matrix metalloproteinase-1 is associated with benign hyperplasia of myo- and endometrium in the Russian population. Genet. Test Mol. Biomarkers. 2012; 16 (9): 1032–7.
41. Takemura N., Yoshida S., Kennedy S., Deguchi M., Ohara N., Maruo T. Matrix metalloproteinase-1 and -9 promoter polymorphisms are not associated with an increased risk of uterine leiomyomas in a Japanese population. J. Soc. Gynecol. Investig. 2006; 13 (3): 232–6.

Поступила 14 мая 2014 г.

Новости науки

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИКАТОВ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ДОЛЖНО БЫТЬ ВЗЯТО ПОД КОНТРОЛЬ

Согласно исследованиям Гарвардского университета здравоохранения, токсические химические соединения могут быть причиной значительного роста нейродегенеративных заболеваний у детей – таких, как аутизм, дизлексия, синдром ADHD (attention-deficit hyperactivity disorder – гиперактивности и нарушения внимания). Ученые утверждают: необходимо срочно разработать систему строгого контроля использования ряда веществ, токсическое действие которых доказано в последнее время. Полный текст сообщения опубликован в февральском номере журнала Lancet Neurology. Эти же авторы в 2006 г. опубликовали список 5 химических соединений, вызывающих токсические поражения нервной системы, особенно на стадии ее развития и формирования. В докладе 2014 г. в этот список вошли еще 6 новых веществ, включая марганец, фтористые соединения, пестициды хлорпирифос и ДДТ, тетрахлорэтилен (растворитель) и многобромистые дифениловые эфиры (ингибиторы горения). Эти соединения вызывают нейротоксические повреждения: марганец – ухудшение интеллекта и нарушение двигательных функций, растворители – гиперактивность и агрессивное поведение, пестициды могут вызывать когнитивные расстройства.

Lancet Neurology, February 2014
DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70278-3.

© **М.С. Чесноков, Н.Л. Лазаревич**, 2014
УДК 616.37-006.6-091.8

ПОВЫШЕНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ПРОТОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОДАВЛЕНИИ СИНТЕЗА ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА HNF4α

М.С. Чесноков, **Н.Л. Лазаревич**, доктор биологических наук

НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: disasterrr19@gmail.com

Введение. *Протоковая аденокарцинома (ПАК) поджелудочной железы (ПЖ) отличается высокой агрессивностью и низкой эффективностью диагностики и терапии. Одним из возможных регуляторов развития и дифференцировки клеток ПЖ является ядерный рецептор HNF4α, выполняющий функции опухолевого супрессора в клетках печени, кишечника и почки. На сегодняшний день роль изменений экспрессии HNF4α в прогрессии ПАК ПЖ исследована мало.*

Цель исследования. *Анализ влияния подавления синтеза HNF4α в высокодифференцированных клетках ПАК ПЖ человека CaPan2 на их биологические свойства, определяющие злокачественный потенциал.*

Методы. *С помощью РНК-интерференции получены культуры клеток CaPan2 с подавленным синтезом HNF4α. Исследовано влияние подавления HNF4α на скорость роста, интенсивность синтеза ДНК, способность к колониеобразованию и направленной миграции клеток CaPan2.*

Результаты. *Подавление синтеза фактора HNF4α в культурах CaPan2 привело к достоверному увеличению скорости их роста in vitro. Это ускорение сопровождалось повышением доли клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, т.е. интенсификацией ДНК-синтеза. Для клеток с подавленным синтезом HNF4α характерна повышенная способность к образованию колоний в условиях высокого разведения и направленной миграции по градиенту хемоаттрактанта.*

Заключение. *Подавление синтеза фактора HNF4α в высокодифференцированных клетках ПАК ПЖ человека вызывает четко выраженное повышение их злокачественного потенциала. Таким образом, HNF4α в клетках ПАК ПЖ может выполнять роль опухолевого супрессора.*

Ключевые слова: *протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, HNF4α, злокачественный потенциал, опухолевый супрессор*

INCREASE IN THE MALIGNANT PROPERTIES OF HUMAN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA CELLS DUE TO REPRESSION OF HNF4α NUCLEAR RECEPTOR SYNTHESIS

M.S. Chesnokov, N.L. Lazarevich

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478

Introduction. *Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is notable for its high aggressiveness and low efficiency of diagnostic and treatment approaches. Nuclear receptor HNF4α is one of the possible regulators of the development and differentiation of pancreatic cells which acts as a tumor suppressor in hepatic, intestinal and kidney cells. The role of HNF4α deregulation in PDAC progression is poorly investigated up to date.*

The aim. *The analysis of the influence of HNF4α repression in highly differentiated human PDAC cells CaPan2 on their biological properties determining the malignant potential.*

Methods. *CaPan2 cell cultures with repressed HNF4α synthesis were obtained using RNA-interference. The impact of HNF4α downregulation upon cells growth rate, DNA synthesis intensity, colony formation and directional migration was estimated.*

Results. *HNF4α synthesis inhibition in CaPan2 cell cultures resulted in the significant increase in their in vitro growth rate. This growth acceleration was accompanied by the increase in the fraction of cells that were in S-phase of cell cycle that indicated the intensification of the DNA synthesis. Cells with repressed HNF4α synthesis are characterized by higher ability to form colonies in the conditions of high dilution and to directionally migrate along the gradient of chemoattractant.*

Conclusion. *Repression of HNF4α synthesis in highly differentiated human PDAC cells causes the significant increase in their malignant potential. Thus, HNF4α may act as a tumor suppressor in PDAC cells.*

Key words: *pancreatic ductal adenocarcinoma, HNF4α, malignant potential, tumor suppressor*

ВВЕДЕНИЕ

Протоковая аденокарцинома (ПАК) поджелудочной железы (ПЖ) – наиболее распространенная и агрессивная форма панкреатических опухолей. Она характеризуется отсутствием симптомов на ранних стадиях развития, высокой скоростью прогрессии, активным метастазированием и низкой эффективностью существующих методов терапии.

Дополнительной проблемой являются поздняя постановка диагноза и отсутствие эффективных биомаркеров этой опухоли [1]. В результате 5-летняя выживаемость пациентов с ПАК ПЖ не превышает 6% [2].

Возникновение и прогрессия ПАК ПЖ сопровождаются нарушениями дифференцировки панкреатических клеток. Основными регуляторами дифференцировочного статуса клеток являются тканеспецифические транскрипционные факторы. В последнее время появляется все больше свидетельств значимости в дифференцировке ПЖ гепатоцитарных ядерных факторов. К этой группе относится 5 неродственных семейств транскрипционных факторов (HNF1, FOXA, HNF4, ONECUT и C/EBP), которые образуют в ряде эпителиальных тканей сложную сеть регуляции транскрипции [3]. Чрезвычайно важным элементом этой сети является ядерный рецептор HNF4α, который экспрессируется в клетках печени, ПЖ, желудка, кишечника, почки и некоторых других органов [4]. HNF4α играет центральную роль в регуляции развития гепатоцитов, контролирует дифференцировку и функции клеток ПЖ и тонкой кишки [5–9]. Экспрессию гена *HNF4α* регулируют 2 независимых промотора – P1 и P2. В результате альтернативного сплайсинга с них может экспрессироваться до 12 изоформ HNF4α (изоформы α1–α6 с промотора P1 и α7–α12 с промотора P2) [10]. Группы изоформ HNF4αP1 и HNF4αP2 отличаются по трансактивационным свойствам и спектру экспрессии в разных тканях [11]. Так, в ПЖ в норме экспрессируются только изоформы группы HNF4αP2, а изоформы HNF4αP1 детектируются в панкреатических клетках только во время эмбриогенеза [12].

В ряде эпителиальных тканей HNF4α может выполнять функцию опухолевого супрессора. Так, развитие гепатоцеллюлярной карциномы ассоциировано с нарушениями экспрессии изоформ HNF4α. Восстановление экспрессии изоформы HNF4α1 в культуре дедифференцированной гепатоцеллюлярной карциномы мыши H33 приводит к частичной реверсии ее злокачественного фенотипа [13]. Описано антипролиферативное действие HNF4α в эпителиальных клетках кишечника и почки [6, 14, 15]. Экзогенная экспрессия HNF4α в культуре инсулиномы также замедляет ее рост [16]. Однако роль нарушения экспрессии HNF4α в развитии ПАК ПЖ пока изучена недостаточно.

Ранее нами было показано, что экзогенная экспрессия изоформ HNF4α в низкодифференцированных клетках ПАК ПЖ Panc1 сопровождается их частичной редифференцировкой и ослаблением злокачественного потенциала [17]. В настоящей работе были использованы высокодифференцированные клетки ПАК ПЖ CaPan2; спектр экспрессии изоформ HNF4α и ключевых регуляторов дифференцировки ПЖ в этих клетках близок к характерному для панкреатической ткани в норме [17]. Подавление синтеза HNF4α в клетках CaPan2 привело к изменению ряда биологических характеристик, свидетельствующих о повышении их злокачественного потенциала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использованы линии клеток ПАК ПЖ человека CaPan2, предоставленные банком клеточных культур Института цитологии РАН. Для получения лентивирусных частиц использовали линию эмбриональных клеток почки человека HEK293T (Invitrogen, США). Клетки HEK293T культивировали в среде DMEM (Sigma, США), клетки CaPan2 – в среде RPMI-1640 (Gibco, США). Среды содержали 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США), 300 мг/л глутамина (ПанЭко, Россия) и 10 мг/л антибиотика ципрофлоксацина. Культивирование проводили в атмосфере 5% CO_2 при 37°C. Приблизительно 1 раз в 5–7 дней клетки обрабатывали трипсином и пересевали.

Плазмидные векторы. В работе использовали лентивирусные векторы для упаковки вирусных частиц pLP1, pLP2 и pCMV-VSVg (Invitrogen, США), лентивирусные векторы pLKO.1-shHNF4α-1-5, экспрессирующие 5 вариантов мшРНК, комплементарных различным участкам молекулы мРНК HNF4α, содержащие ген устойчивости к пуромицину (Sigma, США) и контрольный лентивирусный вектор pLKO.1-shGFP, экспрессирующий малую шпилечную РНК (мшРНК), комплементарную последовательности мРНК зеленого флюоресцентного белка GFP и содержащий ген устойчивости к пуромицину (Sigma, США).

Получение культур с подавленным синтезом HNF4α. Клетки линии HEK293T трансфицировали плазмидными векторами (3 вектора, необходимые для упаковки вируса, и вектор, кодирующий мшРНК к последовательности HNF4α или GFP), используя метод кальцийфосфатной трансфекции. Культуральную среду клеток HEK293T, содержащую лентивирусные частицы, очищали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и вносили в чашки с клетками CaPan2. Заражение проводили в течение 3 сут, после чего выполняли селекцию в среде, содержащей 2 мкг/мл пуромицина, в течение 10 сут.

Иммуноблоттинг. Клетки лизировали с помощью буфера RIPA (Roche, Швейцария). В лунки 10% полиакриламидного геля вносили по 20 мкг белка, разделяли белки электрофорезом и переносили на PVDF-мембрану (Merck Millipore, США) согласно стандартному протоколу, в приборе Bio-Rad's Modular Mini Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, США). Мембрану инкубировали 30 мин в 5% растворе обезжиренного молока на PBST, 90 мин – в растворе моноклональных антител мыши к GAPDH (ZG003, Invitrogen, США, 1:5000) или HNF4α (H1415, R&D Systems, США, 1:4000) на 5% молоке и 60 мин – в растворе моноклональных антител козы к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson

ImmunoResearch Laboratories Inc., США) на 5% молоке. Мембрану проявляли с помощью реактива Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, США). Для документации и обработки изображения использовали пакет программ TotalLab 2.01 (TotalLab Ltd., Великобритания).

Определение кинетики роста клеточных культур. В лунки 96-луночного планшета вносили по 2000 клеток, инкубировали планшеты при 37°С в атмосфере 5% CO_2 в течение 24, 48, 72 и 96 ч. После инкубации фиксировали количество клеток в лунках планшета с помощью набора для определения клеточной пролиферации CyQUANT NF Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, США) по протоколу производителя. Интенсивность флюоресценции проходили с помощью плашечного считывателя SpectraMax M5e (Molecular Devices, США).

Анализ активности синтеза ДНК. Относительную активность синтеза ДНК в клетках определяли по включению 5-бромдезоксиуридина (5-BrdU), встраивающегося в синтезируемую ДНК вместо тимина. Исследуемые клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, инкубировали 2 ч в среде, содержащей 10 мМ 5-BrdU. После инкубации клетки фиксировали метанолом при -20°С 20 мин, обрабатывали 1% раствором Triton X-100 (Хеликон, Россия) 3 мин и 4Н раствором HCl 10 мин при комнатной температуре. Неспецифическое связывание блокировали 3% раствором BSA (Sigma, США) на PBS. Препараты последовательно окрашивали антителами мыши к 5-BrdU (ZBU 30, 1:100, Zymed Laboratories Inc., США) и антителами козы к γ-глобулинам мыши, конъюгированными с флюоресцентной меткой Alexa 488 (1:200, Invitrogen, США). Долю клеток, меченных 5-BrdU, подсчитывали с помощью флюоресцентного микроскопа Axioplan 2 (Carl Zeiss, США).

Анализ колониеобразующих свойств. В чашки Петри диаметром 3 см (Greiner Bio One, Германия) вносили по 2000 клеток и культивировали 14 сут. Колонии клеток фиксировали метанолом при -20°С и окрашивали кристаллическим фиолетовым (ПанЭко, Россия). Для документации и анализа использовали пакет программ TotalLab 2.01 (TotalLab Ltd., Великобритания).

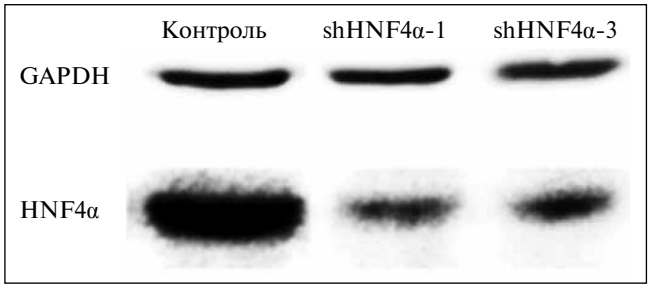

Рис. 1. *Сравнение уровней синтеза белка HNF4α в исследованных клеточных культурах методом иммуноблоттинга. Использовали антитела HNF4α, связывающиеся со всеми изоформами HNF4α. Уровни синтеза GAPDH использовали для контроля общего количества белка в пробах*

Анализ способности к направленной миграции. В лунки 24-луночного планшета устанавливали вставки для определения направленной миграции BD Falcon Cell Culture Insert (BD Biosciences, США) с размером пор 8,0 мкм. В верхнюю камеру вносили 20 000 клеток в среде, не содержащей сыворотки. В нижнюю камеру вносили среду, содержащую 5% фетальную телячью сыворотку в качестве хемоаттрактанта. Планшет с камерами инкубировали при 37°С в атмосфере 5% CO_2 в течение 16 ч. После инкубации клетки из верхней камеры удаляли ватной палочкой, клетки на нижней стороне мембраны окрашивали кристаллическим фиолетовым («ПанЭко», Россия) и подсчитывали при помощи микроскопа.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполняли не менее чем в 3 повторах. Данные обрабатывали в программах Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) и Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation, США), используя t-тест Стьюдента (кинетика роста, клоногенный тест) и U-тест Манна–Уитни (синтез ДНК, миграционный тест). Достоверными считали отличия при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью лентивирусной трансдукции были получены 5 клеточных культур CaPan2, экспрессирующих варианты мшРНК к последовательности мРНК HNF4α (shHNF4α), и контрольная культура CaPan2, экспрессирующая мшРНК к мРНК GFP. Ранее нами было показано, что в клетках CaPan2 экспрессируются только изоформы группы HNF4αP2 и не детектируется экспрессия изоформ группы HNF4αP1 [17]. Во время предварительного исследования экспрессии изоформ HNF4α в полученных культурах CaPan2-shHNF4α мы также детектировали только экспрессию изоформ группы HNF4αP2 (данные не представлены). Поэтому для оценки эффективности подавления синтеза HNF4α в полученных культурах с помощью иммуноблоттинга были использованы антитела к консервативному эпитопу HNF4α, общему для всех изоформ этого фактора. Результаты анализа уровня синтеза белка HNF4α во всех полученных культурах позволили выбрать для дальнейших исследований культуры shHNF4α-1 и shHNF4α-3, в которых подавление HNF4α было максимальным по сравнению с контрольной культурой (рис. 1).

Чтобы выявить изменения биологических свойств клеток CaPan2, отвечающих за формирование злокачественного фенотипа, которые могли быть вызваны подавлением в них HNF4α, мы провели ряд функциональных тестов, направленных на оценку пролиферативного, клоногенного и миграционного потенциала клеток. Скорость роста обеих культур CaPan2-shHNF4α *in vitro* достоверно повысилась по сравнению с контрольной культурой (рис. 2*а*). Наблюдаемое ускорение роста сопровождалось усилени-

ем ДНК-синтетических процессов, что выразилось в повышении доли клеток, находящихся в S-фазе и активно включающих 5-BrdU (рис. 2*б*). Параллельно с усилением пролиферативной активности повысилась способность клеток CaPan2 shHNF4α к образованию колоний в условиях высокого разведения (рис. 2*в*) и к направленной миграции сквозь мембрану камеры Бойдена по градиенту хемоаттрактанта (среды с 5% фетальной телячьей сывороткой) (рис. 2*г*). Описанный комплекс изменений биологических характеристик указывает на повышение злокачественного потенциала клеток CaPan2 при подавлении в них синтеза фактора HNF4α.

Сегодня достаточно подробно опухолесупрессорная функция фактора HNF4α исследована только в клетках гепатоцеллюлярной карциномы. Ее прогрессия сопровождается нарушением экспрессии изоформ HNF4α, а экзогенная экспрессия HNF4α1 в клеточных культурах гепатоцеллюлярной карциномы приводит к их частичной редифференцировке, восстановлению эпителиальной морфологии, ослаблению пролиферативной, миграционной и инвазивной активности [13, 18]. Противоопухолевое действие HNF4α в других тканях изучено намного меньше. Так, в клетках кишечника, почки и инсулиномы продемонстрирована только антипролиферативная функция HNF4α [6, 14, 15, 16]. Ранее нами было показано, что экзогенная экспрессия HNF4α в низкодифференцированных клетках ПАК ПЖ приводит к их частичной редифференцировке и ослаблению их злокачественного потенциала [17]. Поэтому мы предположили, что подавление HNF4α в высокодифференцированных клетках CaPan2 будет сопровождаться усилением их злокачественных свойств. Действительно, клетки культур CaPan-shHNF4α отличаются от контрольной культуры повышенной пролиферативной активностью, что подтверждает антипролиферативную функцию HNF4α. Более того,

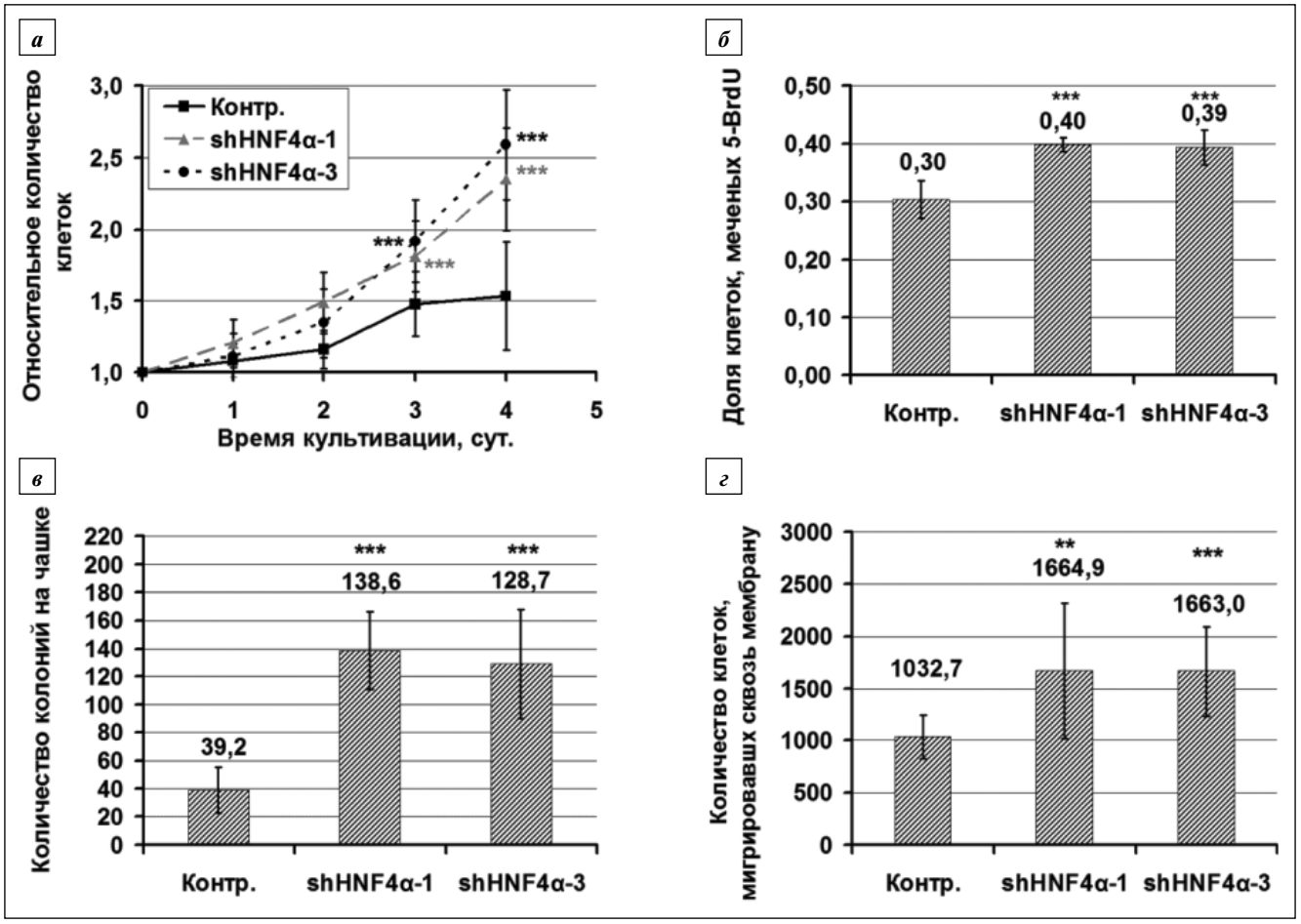

Рис. 2. *Влияние подавления HNF4α на опухолевый фенотип клеток CaPan2: а – кинетические кривые роста клеточных культур в течение 4 сут. Данные нормированы относительно начального количества клеток; б – доля активно синтезирующих ДНК и включающих 5-BrdU клеток в логарифмической фазе роста клеточных культур; в – количество колоний, образуемых клетками в условиях высокого разведения (2000 клеток на 1 чашку Петри диаметром 3 см); г – количество клеток, мигрировавших сквозь мембрану камеры Бойдена по градиенту хемоаттрактанта (фетальная телячья сыворотка). Для всех экспериментов приведены средние значения и стандартные отклонения среднего. ** – p<0,01, *** – p<0,001*

снижение синтеза HNF4α привело к достоверному усилению колониеобразующей и миграционной способности клеток CaPan2. Этот комплекс изменений однозначно указывает на приобретение ими более агрессивного фенотипа. Возможно, усиление клоногенного потенциала клеток CaPan2-shHNF4α объясняется повышенной способностью одиночных клеток делиться и образовывать колонии в условиях высокого разведения. Повышенная миграционная способность клеток CaPan2-shHNF4α соответствует общей тенденции к усилению злокачественности, однако механизмы, связывающие HNF4α с клеточной миграцией, пока не исследованы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли фактора HNF4α в регуляции биологических свойств клеток ПАК ПЖ, связанных с формированием их опухолевого фенотипа. Клетки CaPan2, в которых был подавлен синтез изоформ группы HNF4αP2, характерных для нормальной панкреатической ткани, отличаются от контрольных ярко выраженным повышением злокачественного потенциала, выражающемся в усилении их пролиферативной, клоногенной и миграционной активности. Таким образом, фактор HNF4α в клетках ПАК ПЖ проявляет свойства, характерные для опухолевого супрессора, и представляет собой объект для дальнейших исследований, направленных на выявление молекулярных механизмов развития ПАК ПЖ.

* * *

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 13-04-02080-а.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чесноков М.С., Шавочкина Д.А., Горев А.Д., Лазаревич Н.Л. Молекулярные биомаркеры протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и возможности их использования в клинической практике. Молекулярная медицина. 2013; 6: 21–6. (Chesnokov M.S., Shavochkina D.A., Gorev A.D., Lazarevich N.L. Molecular biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma and their usefulness in clinical practice. Molekulyarnaya meditsina. 2013; 6: 21–6 (in Russian))
2. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA. Cancer. J. Clin. 2013; 63 (1): 11–30.
3. Lazarevich N.L., Fleishman D.I. Tissue-specific transcription factors in progression of epithelial tumors. Biochemistry (Mosc). 2008; 73 (5): 573–91.
4. Tanaka T., Jiang S., Hotta H. et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. J. Pathol. 2006; 208 (5): 662–72.
5. Boj S.F., Parrizas M., Maestro M.A., Ferrer J. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. Prot. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98 (25): 14481–6.
6. Cattin A.L., Le Beyec J., Barreau F. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. Mol. Cell. Biol. 2009; 29 (23): 6294–308.
7. Hayhurst G.P., Lee Y.H., Lambert G. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. Mol. Cell Biol. 2001; 21 (4): 1393–403.
8. Odom D.T., Zizlsperger N., Gordon D.B. et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. Science. 2004; 303 (5662): 1378–81.
9. Parviz F., Matullo C., Garrison W.D. et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. Nat. Genet. 2003; 34 (3): 292–6.
10. Nakhei H., Lingott A., Lemm I., Ryffel G.U. An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types. Nucleic. Acids Res. 1998; 26 (2): 497–504.
11. Torres-Padilla M.E., Sladek F.M., Weiss M.C. Developmentally Regulated N-Terminal Variants of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4α Mediate Multiple Interactions through Coactivator and Corepressor-Histone Deacetylase Complexes. J. Biol. Chem. 2002; 277 (47): 44677–87.
12. Harries L.W., Locke J.M., Shields B. et al. The diabetic phenotype in HNF4α mutation carriers is moderated by the expression of HNF4α isoforms from the P1 promoter during fetal development. Diabetes. 2008; 57 (6): 1745–52.
13. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V. et al. Progression of HCC in Mice Is Associated With a Downregulation in the Expression of Hepatocyte Nuclear Factors. Hepatology. 2004; 39 (4); 1038–47.
14. Chiba H., Itoh T., Satohisa S. et al. Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4alpha. Exp. Cell. Res. 2005; 302 (1); 11–21.
15. Grigo K., Wirsing A., Lucas B. et al. HNF4 alpha orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells. Biol. Chem. 2008; 389 (2): 179–87.
16. Erdmann S., Senkel S., Arndt T. et al. Tissue-specific transcription factor HNF4alpha inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line. Biol. Chem. 2007; 388 (1): 91–106.
17. Чесноков М.С., Кустова И.Ф., Шавочкина Д.А. и соавт. Частичная редифференцировка и понижение выраженности черт злокачественного фенотипа клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека при экспрессии ядерного рецептора HNF4α. Российский биотерапевтический журнал. 2012; 11 (3): 17–23. (Chesnokov M.S., Kustova I.F., Shavochkina D.A. et al. Partial redifferentiation and decrease in malignant properties of human pancreatic ductal adenocarcinoma cells expressing nuclear receptor HNF4α. Rossiskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2012; 11 (3): 17–23 (in Russian))
18. Cozzolino A.M., Alonzi T., Santangelo L. et al. TGFβ overrides HNF4α tumor suppressing activity through GSK3β inactivation: implication for hepatocellular carcinoma gene therapy. J. Hepatol. 2013; 58 (1); 65–72.

Поступила 17июня 2014 г.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 618.19-006.6-037-078.33

ФОСФОРИЛИРОВАННАЯ КИНАЗА AKT1, ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ЕГО РЕЦЕПТОРЫ: ВНУТРИОПУХОЛЕВОЕ СОДЕРЖАНИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.М. Щербаков, кандидат биологических наук, **Е.С. Герштейн**, доктор биологических наук, профессор, **Е.В. Ошкина**, **И.К. Воротников**, доктор медицинских наук, профессор, **Н.Е. Кушлинский**, член-корреспондент РАН, профессор

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: alex.scherbakov@gmail.com

Введение. *Сигнальный путь фосфорилированной киназы (PI3K/Akt) – важный внутриклеточный регуляторный механизм, контролирующий стимулы ростовых факторов, апоптоз, пролиферацию и подвижность клеток. Нарушение активности/экспрессии белков сигнального пути PI3K/Akt определяет развитие опухолей различного генеза и перспективность исследования этих показателей в качестве возможных факторов прогноза онкологических заболеваний.*

Цель исследования. *Оценка прогностического значения активированной (фосфорилированной) киназы Akt1 (pAkt1) и ассоциированных с ней белков фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и 2 форм его рецепторов (VEGFR1 и VEGFR2) при раке молочной железы (РМЖ).*

Методы. *В исследование вошли 46 больных РМЖ I–IV стадии. Уровень pAkt1, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 определяли в лизатах опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей с помощью стандартных наборов для иммуноферментного анализа (R&D; Cell Signaling Technology, США).*

Результаты. *Приблизительно у 50% больных РМЖ повышается уровень pAkt1 в опухоли по сравнению с таковым в гомологичной неизмененной ткани. При этом активность Akt1 возрастает на поздних стадиях заболевания, в опухолях больших размеров. Уровень вышележащих эффекторов Akt1 VEGF, VEGFR1, VEGFR2 повышен в 73–85% исследованных опухолей по сравнению с показателями в неизмененных тканях. Анализ 9-летней выживаемости больных РМЖ показал, что наиболее перспективными прогностическими факторами являются внутриопухолевое содержание белка pAkt1 и одного из его эффекторов – VEGFR1.*

Заключение. *Внутриопухолевое содержание белка pAkt1 и его эффектора VEGFR1 может рассматриваться в качестве фактора прогноза при РМЖ.*

Ключевые слова: *рак молочной железы, Akt1, VEGF, VEGFR, прогностические факторы*

THE PHOSPHORYLATED AKT1 KINASE, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTORS: INTRATUMORAL CONTENT AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN BREAST CANCER PATIENTS

A.M. Scherbakov, E.S. Gershtein, E.V. Oshkina, I.K. Vorotnikov, N.E. Kushlinskii

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse 24, Moscow, Russian Federation, 115478

Introduction. *PI3K/Akt signaling pathway is an important intracellular regulatory mechanism controlling cues of growth factors stimuli, apoptosis, proliferation, and cell motility. Deregulation of activity/expression of PI3K/Akt signaling pathway proteins determines the development of different types of cancers, and according to recent studies these proteins may become promising prognostic factors in various types of cancer.*

The aim of the study. *The goal of this study is to assess potential prognostic value of activated (phosphorylated) Akt1 kinase (pAkt1) and Akt1-associated proteins – vascular endothelial growth factor (VEGF) and two types of its receptors (VEGFR1 and VEGFR2) in breast cancer (BC).*

Methods. *Study group enclosed 46 stage I-IV breast cancer patients. pAkt1, VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 levels in tumor lysates were determined with the use of standard ELISA kits (R&D; Cell Signaling Technology, USA).*

Results. *Approximately in 50% of breast cancer patients pAkt1 in tumors was elevated if compared to histologically unchanged mammary gland tissues. In this tumor Akt1 activity increases at late stages of the disease and in large tumors. The level of such upstream Akt1 effectors as VEGF, VEGFR1, VEGFR2 were elevated in 73-85% of investigated tumors if compared to unchanged tissues. The 9-year's survival analysis of breast cancer patients revealed that the most promising prognostic factors could be the level both of intratumoral pAkt1 and one of its effectors, VEGFR1.*

Conclusion. *Tumor pAkt1 and its effector VEGFR1 content may be considered as potential prognostic factor in breast cancer patients.*

Key words: *breast cancer, Akt1, VEGF, VEGFR, prognostic factors*

Трансформация клеток неизмененного эпителия молочной железы в опухолевые представляет собой многостадийный процесс, затрагивающий различные внутриклеточные метаболические пути [1, 2]. Активированные метаболические пути дают новой сформировавшейся популяции опухолевых клеток специфические преимущества, которые определяют быстрый рост опухоли и ее устойчивость к воздействию терапевтических агентов и иммунной системы больного [3, 4]. Среди молекул, поддерживающих опухолевый рост, особый интерес представляют белки PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) и Akt (Protein kinase B, PKB, RAC-PK-α). С одной стороны, эти белки опосредуют в клетках сигнал основных ростовых факторов, с другой –

активируют нижележащие белки-регуляторы пролиферации, апоптоза и клеточной подвижности (такие, как Nuclear factor kappa B – NF-κB, mTOR, FOXO, β-катенин и др.) [5–7]. Классическим механизмом активации PI3K/Akt-сигнального пути принято считать взаимодействие SH2-доменов регуляторной субъединицы p85 PI3K с клеточными тирозинкиназами – как нерецепторными (p60-src), так и рецепторными (EGFR, VEGFR, HER2/neu, PDGFR, FGFR) [7–9].

Вследствие активного развития в последние годы таргетных и персонализированных подходов в терапии рака молочной железы (РМЖ) значительно расширился список препаратов и соединений, проходящих предклиническую фазу исследований [6, 10]. Наиболее перспективными в настоящее время считаются комбинированные схемы терапии, включающие ≥2 молекулярных целей; особенно востребованы такие подходы для опухолей, резистентных к различным видам терапии [11]. В этой связи становятся актуальными поиск новых прогностических показателей РМЖ и выявление групп больных с высокой чувствительностью к таргетным препаратам.

В предыдущих исследованиях мы показали, что белок Akt1 (одна из форм Akt) и его нижележащий эффектор NF-κB являются потенциальными маркерами гормонорезистентности при рецепторположительном РМЖ [12]. Задачей данного исследования было оценить прогностическое значение активированной (фосфорилированной) киназы Akt1 (pAkt1) и ассоциированных с ней белков – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и 2 форм его рецепторов (VEGFR1 и VEGFR2) при РМЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 46 больных РМЖ I–IV стадии, находившихся на лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2002–2004 гг. Больные были в возрасте от 35 до 75 лет (медиана – 55 лет). Распределение по стадиям заболевания оказалось таким: I стадия (T1N0M0) – 2 больных, IIa стадия (T2N0M0) – 17, IIb стадия (T2N1M0) – 14, IIIa стадия (T2N2M0 – 4; T3N1M0 – 3 больных), IIIb стадия (T4N0–2M0) – 5, IV стадия (T2N1M1) – 1.

Образцы опухолей и гистологически неизмененной ткани молочной железы (200–300 мг) были взяты во время хирургической операции и немедленно заморожены в жидком азоте для дальнейшего хранения при -70°C.

Для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) образцы тканей лизировали в соотношении 1:3 в буфере следующего состава: 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Тритон X-100, 2,5 мМ пирофосфат натрия, 1 мМ β-глицерофосфат, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мкг/мл леупептина. Полученные лизаты центрифугировали в течение 30 мин при 22 000 об/мин и 4°C (центрифуга OptimaTM TLX, Beckman, США).

Уровень pAkt1, VEGF, VEGFR1, VEGFR2 в полученных лизатах тканей определяли с помощью стандартных наборов реактивов для ИФА как описано ранее [13]. Для 41 больной удалось проспективно зафиксировать отдаленные результаты лечения, в том числе дату возникновения 1-го рецидива и(или) дату смерти. Всего в ходе исследования отмечено 9 летальных исходов и 3 случая рецидива заболевания.

Статистическую обработку результатов осуществляли в программе Statistica 8.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали следующие методы статистического анализа: критерии Манна–Уитни, Уилкоксона, Краскела–Уоллиса, тест корреляции Пирсона (r). Общую и безрецидивную выживаемость оценивали с помощью метода Каплана–Мейера. Различия и корреляции считали достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным ИФА у 48% обследованных активность Akt1 (уровень фосфорилированной киназы Akt1 или pAkt1) в опухоли была выше, чем в гомологичной гистологически неизмененной ткани. Уровни pAkt1 в опухолевой и неизмененной тканях молочной железы достоверно положительно коррелировали между собой ($r=0,5$; $p<0,05$). Было установлено достоверное ($p<0,05$) повышение уровня pAkt1 в опухоли на поздних стадиях заболевания (III–IV) по сравнению с таковым при ранних стадиях (I–IIa). Кроме того, обнаружена достоверная взаимосвязь уровня pAkt1 с размером опухоли: в 71% опухолей больших размеров (>5 см) наблюдалось увеличение активности pAkt1 (по сравнению с ее уровнем в гистологически неизмененной ткани), а в небольших опухолях – только в 42% образцов ($p<0,05$).

С учетом описанных фактов и данных литературы о роли белка Akt1 в прогрессии и терапевтической устойчивости опухолей [12, 14, 15] мы предположили, что значительное накопление pAkt1 в опухоли может быть фактором, влияющим на выживаемость, и разделили больных на 2 группы, используя в качестве пограничного значения медиану (Me) уровня pAkt1 в опухоли, составившую в исследованной выборке 0,379 ед/мг белка.

Для анализа безрецидивной и общей выживаемости больные также были разделены на 2 группы в зависимости от соотношения активности Akt1 в опухоли и гистологически неизмененной ткани. На момент начала исследования в сформированные группы входили от 15 до 21 больной РМЖ. Обнаружена тенденция к снижению безрецидивной выживаемости у больных с повышенной активностью Akt1 в опухоли ($p=0,17$) по сравнению с пациентками, у которых активность Akt1 в опухоли была ниже, чем в окружающей ткани (рис. 1*а*). Взаимосвязи общей выживаемости с увеличением содержания pAkt1 в опухоли по сравнению с уровнем в нормальной ткани не выявлено. На рис. 1*б* продемонстрирована тенденция к увеличению общей 9-летней (108 мес) выживаемости у больных с уровнем pAkt1 в опухоли, не превышающим Me, по сравнению с показателем в группе с более высоким уровнем данного маркера ($p=0,12$).

Анализ вышележащих эффекторов киназы Akt1 белков VEGF, VEGFR1, VEGFR2 выявил рост этих показателей в 73–85% исследованных опухолей по сравнению с уровнем неизмененных тканях. Таким образом, у большинства обследованных внутриопухолевое содержание VEGF, VEGFR1, VEGFR2 увеличено, и не представляется возможным стратифицировать больных в зависимости от превышения этих показателей в опухоли по сравнению с уровнем в неизмененной ткани молочной железы.

Группы для анализа 9-летней выживаемости формировали в зависимости от средних значений и медиан исследованных показателей в опухоли. Взаимосвязи уровня VEGF и VEGFR2 в опухоли с общей и безрецидивной выживаемостью больных РМЖ не выявлено. В то же время 9-летняя безрецидивная выживаемость у больных с внутриопухолевым содержанием VEGFR1 ниже среднего значения (составившего по выборке 2,40 нг/мг белка) была выше, чем в группе, в которой VEGFR1 превышал средний показатель (p=0,05; рис. 2). На момент проведения анализа в группе, включавшей 15 больных с пониженным содержанием VEGFR1 в опухоли, рецидивов не зафиксировано.

В предыдущей работе мы провели комплексное исследование содержания киназы Akt1, ее активированной формы pAkt1 и активности ее основного нижележащего эффектора NF-κB при РМЖ [12]. Оказалось, что приблизительно в 90% опухолей у больных РМЖ координированно увеличиваются содержание киназы Akt1, субъединицы NF-κB p65, IκBα (ингибитора NF-κB), а также ДНК-связывающая активность NF-κB [12]. При этом активность субъединицы NF-κB p50 достоверно коррелировала с уровнем pAkt1, что косвенно указывает на повышенную внутриопухолевую активность сигнального пути PI3K/Akt/NF-κB в исследованной группе. Удельная ДНК-связывающая активность NF-κB p65 наиболее высока в опухолях с «тройным отрицательным» рецепторным статусом [ER(-)PR(-) HER2/neu(-)], не поддающихся ни эндокринной, ни молекулярно-направленной терапии, отсюда именно в этой подгруппе больных РМЖ возможно преимущество от использования селективных ингибиторов NF-κB и ее вышележащего эффектора Akt.

Перспективность исследования белков сигнального пути PI3K/Akt в качестве новых терапевтических мишеней и потенциальных факторов прогноза РМЖ активно обсуждается в работах, опубликованных за последние годы [6, 16–18]. J. Liu и соавт. с помощью иммуногистохимического анализа определили уровень Skp2, pAkt1 и p27 у 251 больной распространенным РМЖ [16]. Белки Skp2 и p27 являются нижележащими эффекторами киназы Akt1 [19], при этом увеличенное содержание Skp2 и пониженное – p27 ассоциировано с опухолями различного генеза. J. Liu и соавт. выявили, что комплексная оценка уровней pAkt1 и Skp2 в цитоплазме опухолевых клеток позволяет сформировать группы больных с высокой общей и безрецидивной выживаемостью. Обнаружено, что у больных РМЖ с низкими значениями pAkt1 низкое содержание Skp2 определяет высокие показатели общей и безрецидивной 10-летней выживаемости (p=0,003), тогда как в группе с высоким уровнем pAkt1 в опухоли Skp2 перестает играть роль фактора прогноза (p=0,949).

К сожалению, ограниченность выборки в нашей работе не позволила разделить больных на группы для одновременного анализа выживаемости по несколь-

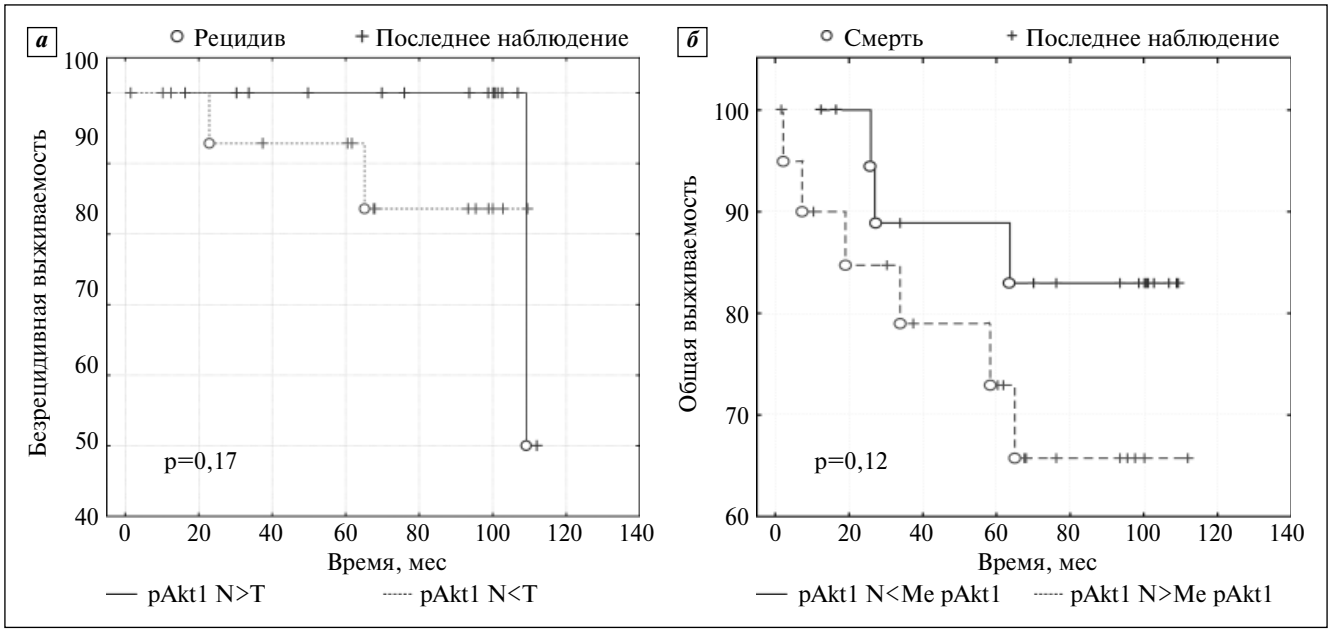

Рис. 1. *Безрецидивная и общая выживаемость больных РМЖ в зависимости от внутриопухолевого уровня pAkt1: а – безрецидивная выживаемость в зависимости от соотношения уровня pAkt1 в неизмененной ткани (N) и в опухоли (T); б – общая выживаемость в зависимости от уровня pAkt1 в опухоли с использованием в качестве порогового значения Me содержания pAkt1 в опухоли*

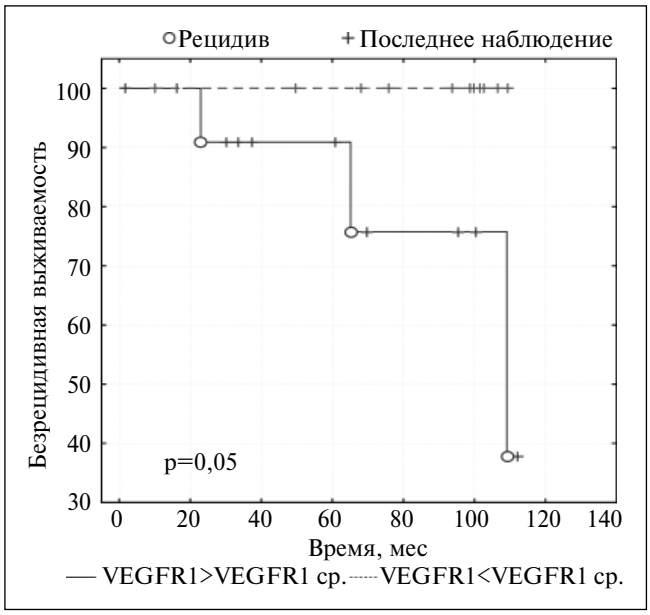

Рис. 2. *Безрецидивная выживаемость больных РМЖ в зависимости от уровня VEGFR1 в опухоли (ср. – среднее значение VEGFR1 в опухолях больных РМЖ)*

ким факторам, однако на основании обнаруженных тенденций можно сделать вывод о перспективности комплексного определения pAkt1 и VEGFR1: низкий уровень этих показателей в опухоли позволит выявить группу с хорошим прогнозом при РМЖ.

Исследование M. Wennemers и соавт. [20] также свидетельствует о важном прогностическом значении pAkt. Авторы обнаружили достоверное увеличение 5-летней безрецидивной выживаемости у больных РМЖ с pAkt-негативными опухолями (86,1% по сравнению с 64,6% в pAkt-позитивной группе; p=0,03). По данным этих авторов, киназа Akt активируется преимущественно в участках опухоли, подверженных гипоксии, что может выступать в роли фактора устойчивости к химио- и радиотерапии и определять плохой прогноз заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании продемонстрировано, что приблизительно у 50% больных РМЖ увеличивается уровень pAkt1 в опухоли по сравнению с таковым в гомологичной неизмененной ткани. При этом активность Akt1 возрастает на поздних стадиях заболевания, в опухолях больших размеров. Уровень вышележащих эффекторов Akt1 VEGF, VEGFR1, VEGFR2 в 73–85% опухолей выше, чем в неизмененных тканях. Анализ 9-летней выживаемости больных РМЖ показал, что наиболее перспективными прогностическими показателями являются внутриопухолевое содержание белка pAkt1 и одного из его эффекторов – VEGFR1.

Таким образом, результаты опубликованных исследований и наши собственные данные указывают на перспективность использования киназы Akt1 и ассоциированных с ней белков (Skp2, VEGFR1) для многофакторной оценки прогноза при РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144 (5): 646–74.
2. Eroles P., Bosch A., Perez-Fidalgo J.A., Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. Cancer Treat. Rev. 2012; 38 (6): 698–707.
3. Schiff R., Massarweh S., Shou J., Osborne C.K. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. Clin. Cancer Res. 2003; 9 (1 Pt 2): 447–54.
4. Wind N.S., Holen I. Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. Int. J. Breast Cancer. 2011; 2011: 967419.
5. Liang K., Jin W., Knuefermann C., Schmidt M., Mills G.B., Ang K.K., Milas L., Fan Z. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway for enhancing breast cancer cells to radiotherapy. Mol. Cancer Ther. 2003; 2 (4): 353–60.
6. Owonikoko T.K., Khuri F.R. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 2013; 2013: 395–401.
7. Krasilnikov M.A. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. Biochemistry (Biokhimiia). 2000; 65 (1): 59–67.
8. Franke T.F., Hornik C.P., Segev L., Shostak G.A., Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. Oncogene. 2003; 22 (56): 8983–98.
9. Sun M., Paciga J.E., Feldman R.I., Yuan Z., Coppola D., Lu Y.Y., Shelley S.A., Nicosia S.V., Cheng J.Q. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. Cancer Res. 2001; 61 (16): 5985–91.
10. Seshacharyulu P., Ponnusamy M.P., Haridas D., Jain M., Ganti A.K., Batra S.K. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets. 2012; 16 (1): 15–31.
11. Scherbakov A.M., Krasil'nikov M.A., Kushlinskii N.E. Molecular mechanisms of hormone resistance of breast cancer. Bul. Exp. Biol. Med. 2013; 155 (3): 384–95.
12. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Тулеуова А.А., Овчинникова Л.К., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования экспрессии и активности некоторых компонентов NF-κB-сигнального пути в опухолях больных раком молочной железы. Технологии живых систем. 2011; (8): 14–23. (Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Tuleuova A.A., Ovchinnikova L.K., Kushlinskii N.E. Clinical prospects of the study of NF-κB signaling pathway components expression and activity in the tumors of breast cancer patients. Tekhnologii zhivykh sistem. 2011; (8): 14–23 (in Russian))
13. Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Анурова О.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов, его рецепторы и антиапоптотические белки Bcl-2 и Akt при раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы (Маммология). 2006; (3): 63–8. (Scherbakov A.M., Gershtein E.S., Anurova O.A., Kushlinskii N.E. Vascular endothelial growth factor, its receptors, and antiapoptotic proteins Bcl-2 and pAkt in breast cancer. Opukholi zhenskojj reproduktivnojj sistemy (Mammologija). 2006; (3): 63–8 (in Russian))
14. Sun M., Wang G., Paciga J.E., Feldman R.I., Yuan Z.Q., Ma X.L., Shelley S.A., Jove R., Tsichlis P.N., Nicosia S.V., Cheng J.Q. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. Am. J. Pathol. 2001; 159 (2): 431–7.
15. Perez-Tenorio G., Stal O. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. Br. J. Cancer. 2002; 86 (4): 540–5.
16. Liu J., Wei X.L., Huang W.H., Chen C.F., Bai J.W., Zhang G.J. Cytoplasmic Skp2 expression is associated with p-Akt1 and predicts poor prognosis in human breast carcinomas. PLoS One. 2012; 7 (12): e52675.
17. Liu C., Zhou S., Ke C.S., Li N.P., Wu R.L. (Activation and prognostic significance of AKT, NF-kappaB and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression). Ai Zheng. 2007; 26 (9): 929–36.
18. Cavazzoni A., Bonelli M.A., Fumarola C., La Monica S., Airoud K., Bertoni R., Alfieri R.R., Galetti M., Tramonti S., Galvani E., Harris A.L., Martin L.A., Andreis D., Bottini A., Generali D., Petronini P.G. Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones. Cancer Letters. 2012; 323 (1): 77–87.
19. Gao D., Inuzuka H., Tseng A., Chin R.Y., Toker A., Wei W. Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCCdh1-mediated Skp2 destruction. Nature Cell. Biology. 2009; 11 (4): 397–408.
20. Wennemers M., Stegeman H., Bussink J., Versleijen-Jonkers Y.M., van Laarhoven H.W., Raleigh J.A., Varia M.A., Sweep F.C., Span P.N. Hypoxia regulation of phosphokinases and the prognostic value of pAKT in breast cancer. Int. J. Biol. Markers. 2013; 28 (2): 151–60.

Поступила 20 мая 2014 г.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 618.19-006.6-033.2:616.71]-037-078.33

С-КОНЦЕВОЙ ТЕЛОПЕПТИД КОЛЛАГЕНА 1-ГО ТИПА – ФАКТОР ПРОГНОЗА ПОРАЖЕНИЯ СКЕЛЕТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.В. Любимова[1], доктор биологических наук, профессор,
Г.В. Кожарская[2], **Ю.С. Тимофеев**[1], **С.М. Портной**[1], доктор медицинских наук

[1]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24;

[2]Онкологический диспансер №5 Департамента здравоохранения, Российская Федерация, 109451, Москва, Перервинский бульвар, д. 5/1

E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Введение. *Метастатическое поражение костной ткани – одно из наиболее частных осложнений рака молочной железы (РМЖ). Для снижения тяжести и смертности при метастатическом поражении скелета необходимы повышение точности диагностики метастазов в костях и своевременное проведение антирезорбтивной терапии. В последнее время различные биохимические маркеры костного метаболизма нашли применение в диагностике и мониторинге лечения метастазов в костях. Прогностическое значение маркеров резорбции и формирования костной ткани представляет особый интерес с точки зрения оптимизации тактики применения бифосфонатов у больных РМЖ.*

Цель исследования. *Анализ взаимосвязи уровней биохимических маркеров костной резорбции (С-концевого телопептида коллагена 1-го типа – CTX) и остеосинтеза (костной щелочной фосфатазы – КЩФ) с выживаемостью больных РМЖ, прослеженных в течение 6 лет, для оценки их клинического значения.*

Методы. *Серийное определение уровней маркеров костного метаболизма выполняли в сыворотке крови 72 больных РМЖ с метастазами в костях и 167 обследованных без клинических признаков метастатического поражения скелета. В контрольную группу вошли 47 практически здоровых женщин. Для определения концентрации CTX и активности КЩФ на основе иммуноферментного анализа использовали соответствующие тест-системы Serum CrossLaps (Osteometer) и Metra BAP (Quidel Cor.)*

Результаты. *Усиление интенсивности процессов костного ремоделирования коррелировало с высокими уровнями CTX и КЩФ и было связано с достоверным уменьшением показателей общей выживаемости больных РМЖ. Достоверные различия в выживаемости больных с превышавшими пороговые уровни CTX (0,74 нг/мл) и КЩФ (43,7 Ед/л) по сравнению с показателями в пределах нормы получены для всех групп. В группе больных с поражением скелета показатель CTX по сравнению с КЩФ характеризовался более тесной связью с выживаемостью. По данным многофакторного анализа, CTX оказался независимым фактором прогноза развития костных метастазов (наряду со степенью злокачественности опухоли).*

Заключение. *CTX и КЩФ являются значимыми критериями для прогноза метастатического поражения скелета и оптимизации тактики применения бифосфонатов у больных РМЖ. CTX служит независимым фактором прогноза развития костных метастазов.*

Ключевые слова: *С-концевой телопептид коллагена 1-го типа, костная щелочная фосфатаза, рак молочной железы, метастазы в костях, прогноз*

C-TERMINAL TELOPEPTIDE OF TYPE I COLLAGENE – PROGNOSTIC FACTOR OF SKELETAL METASTASES IN BREAST CANCER PATIENTS

N.V. Lyubimova[1], G.V. Kozharskaya[2], Yu.S. Timofeev[1], S.M. Portnoy[1]

[1]N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478;
[2]Oncologic Dispensary № 5, Perervinsky Boulevard, 5/1, Moscow, Russian Federation, 109451

Introduction. *Skeletal involvement is a frequent and troublesome complication of breast malignant tumors. The accurate diagnosis of bone metastasis and well-timed prescription of the antiresorptive therapy are essential for reducing both severity and mortality. Recently different markers of bone turnover are using in diagnosis and monitoring therapeutic response in cancer patients with metastatic bone disease. The predictive value of bone resorption and formation markers in breast cancer patients is of great interest for the optimization of application of bisphosphonates*

The aim of the study. *The analysis of associations between serum C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) as bone resorption and activity of bone-specific alkaline phosphatase (BAP) as formation marker, with survival of breast cancer patients monitored for 6 years were evaluated to reveal their clinical implications.*

Methods. *Serial measures of CTX and BAP in blood serum of 72 breast cancer patient with bone metastasis and 167 – without bone involvement have been done with the use of ELISA test-systems «Serum CrossLaps» (Osteometer) и «Metra BAP» (Quidel Cor.). Control group included 47 healthy females.*

Results. *Elevated rate of bone turnover correlated with high levels of CTX and BAP and was associated with reduced overall survival of breast cancer patients. The significant differences of overall survivability of patients with values higher than cut-off of CTX (0,74 ng/ml) and BAP (43,7 IU/L) if compared to those with normal levels were found in all groups of patients. CTX was superior to BAP as predictor of outcome in breast cancer patients with bone metastases. Multivariate Cox proportional hazards regression analysis revealed that CTX was independent prognostic factor for breast carcinoma related death together with some clinical pathological characteristics (tumor malignancy).*

Conclusion. *Serum CTx and BAP are of value in predicting the status of breast cancer bone metastases and optimization of bisphosphonates therapy. CTX was shown to be independent prognostic factor of bone involvement.*

Key words: *C-telopeptide of type I collagen, bone alkaline phosphatase, breast cancer, bone metastases, prognosis*

Метастатическое поражение костной ткани является одним из наиболее частных осложнений злокачественных опухолей молочной железы. По данным разных авторов, частота метастазирования в кости достигает 50–60% в общей популяции больных раком молочной железы (РМЖ), а при распространенных формах – 70–80%, при этом примерно в 20% наблюдений костные метастазы служат первым проявлением генерализации опухолевого процесса.

Метастазирование в кости обусловливает плохой прогноз течения заболевания, сопровождается частым развитием скелетных осложнений, значительно ухудшая качество жизни больных и повышая риск смерти. В то же время установлено, что у больных с изолированными метастазами в костях более высокая 5-летняя выживаемость, чем при сочетании костных метастазов с висцеральными (соответственно у 20–31% и <20% больных). В этом аспекте очевидна важность своевременной антирезорбтивной терапии [2, 8, 9].

Достижения в изучении механизмов метастазирования в кости и связанного с этим процессом остеолиза, а также успехи современной онкологии в лечении костных метастазов с использованием таргетной терапии обусловливают важность ранней диагностики поражения скелета.

Известно, что метастазирование в костную ткань сопровождается усилением интенсивности процессов резорбции, а также костеобразования в результате стимуляции активности и дифференцировки остеокластов и остеобластов под действием различных ауто- и паракринных факторов, продуцируемых злокачественными клетками [5]. В последнее время существенно возрос интерес к развитию неинвазивных методов диагностики и мониторинга поражения скелета у онкологических больных на основе определения биохимических критериев, отражающих интенсивность процессов резорбции и формирования костной ткани. Уже накоплен определенный клинический материал, свидетельствующий о возможности их использования в диагностике и наблюдении за эффективностью лечения костных метастазов [1, 8–10].

В последнее время усилился интерес к прогностической значимости маркеров остеолиза. Данные по прогностическому значению С- и N-концевых телопептидов коллагена 1-го типа, экскреция которых с мочой усиливается в результате деструкции костного матрикса при поражении скелета у онкологических больных, представлены в ряде работ [2–4, 6, 7]. Следует, однако, отметить, что результаты исследования маркеров резорбции и формирования костной ткани в оценке прогноза поражения скелета у больных РМЖ ограничены отдельными наблюдениями и носят противоречивый характер, что может быть обусловлено выраженной вариабельностью результатов их определения в моче.

Целью настоящего исследования было изучение прогностической значимости биохимических маркеров костного метаболизма, отражающих разные этапы костного ремоделирования, на основе их исследования в сыворотке крови больных РМЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 239 больных РМЖ, из них у 72 пациенток было метастатическое поражение скелета. В качестве группы сравнения обследованы 167 больных РМЖ без клинических или рентгенологических признаков метастатического поражения костей, которые не получали до обследования противоопухолевую терапию. За период 6-летнего наблюдения у 30 (18%) пациенток этой группы развились костные метастазы, выявленные в разные сроки динамического обследования. В контрольную группу вошли 47 практически здоровых женщин.

Диагностика метастазов в костях проводилась на основании данных сцинтиграфии и последующей рентгенографии в плановом порядке. Критерием отбора онкологических больных было отсутствие приема бифосфонатов и лучевой терапии в течение последних 4 мес. Эффективность противоопухолевой терапии оценивали с помощью сцинтиграфии и рентгенографии скелета каждые 6 мес. Критериями прогноза являлись частота скелетных осложнений, время до их наступления, степень болевого синдрома и общая выживаемость.

Биохимические маркеры костного метаболизма исследовали иммуноферментными методами в планшечном варианте на основе высокоспецифичных моноклональных антител. Концентрацию С-концевого телопептида коллагена 1-го типа (CTX, нг/мл) и активность костной щелочной фосфатазы (КЩФ, Ед/л) определяли в сыворотке крови при использовании тест-систем Serum CrossLaps (Osteometer) и Metra BAP (Quidel Cor.).

Статистическую обработку результатов с распределением, отличным от нормального, проводили с

помощью непараметрических методов анализа. Выживаемость и другие временные параметры в группах оценивали путем теста log-rank методом Каплана–Мейера. Различия показателей в изучаемых группах считали значимыми при $p<0,05$. Данные обрабатывали с помощью программы Statistica 8.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ взаимосвязи уровней биохимических маркеров костного метаболизма в сыворотке крови больных РМЖ с основными клиническими особенностями РМЖ, проведенный ранее [1], выявил их зависимость от таких клинических характеристик, как распространенность метастатического поражения скелета, наличие патологических переломов, выраженность болевого синдрома, получаемое обезболивание. В соответствии с установленными закономерностями представлялось важным оценить взаимосвязь СТХ и КЩФ как наиболее информативных показателей поражения скелета с выживаемостью больных в группах пациенток с костными метастазами и без признаков поражения скелета.

Прогностическое значение СТХ и КЩФ оценивали с учетом их пороговых уровней, соответствующих 95% доверительному интервалу, рассчитанному по результатам определения показателей в контрольной группе.

Анализ общей выживаемости проводили в группах больных с исходными метастазами в костях, находившихся на постоянном противоопухолевом лечении, у больных без поражения скелета, а также в подгруппе больных с развившимися в процессе 6-летнего наблюдения метастазами, не получавших до обследования противоопухолевой терапии. В соответствии с кривыми выживаемости, представленными на рис. 1, при значениях СТХ выше порогового уровня (0,74 нг/мл) в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях 3-летняя общая выживаемость была нулевой, тогда как в подгруппе пациенток с низкими показателями она составила 30% ($p<0,05$). При этом медиана общей выживаемости при неблагоприятных (повышенных) уровнях СТХ, отражающих усиленный остеолиз, была ниже (11,9 мес), чем у больных с нормальным остеолизом (21,7 мес); различия достоверны ($p<0,03$). Получены достоверные различия и для КЩФ: 3-летняя общая выживаемость была нулевой при гиперферментемии (>43,7 Ед/л), тогда как при благоприятных (ниже порогового уровня) значениях фермента она составила 39,1%. Медиана выживаемости при показателях КЩФ в пределах нормы была 24,2 мес, достоверно ($p=0,011$) превышая медиану общей выживаемости при гиперферментемии (13,4 мес).

Анализ 5-летней общей выживаемости больных РМЖ без признаков поражения скелета выявил зависимость ее показателей от уровней СТХ и КЩФ как при их первичном определении, так и в процессе динамического наблюдения (рис. 2). При значениях СТХ выше порогового уровня 5-летняя выживаемость составила 28,5%, тогда как при показателях <0,74 нг/мл она была достоверно ($p=0,015$) выше (71,5%). Достоверные различия ($p=0,015$) также установлены с учетом порогового уровня КЩФ (43,7 Ед/л): 5-летняя выживаемость была существенно ниже (23,8%) при гиперферментемии, тогда как при нормальных значениях фермента она достигала 72,2%. При этом медиана выживаемости в подгруппе пациенток с нормальными показателями не была достигнута, тогда как при повышенных уровнях СТХ и КЩФ соответствовала 25–27 мес.

С учетом представленных данных проанализирована также выживаемость в подгруппе больных с развившимися в период наблюдения костными метастазами, у большинства из которых уровни маркеров были повышены. Поскольку СТХ в качестве критерия прогноза проявлял лучшие, чем КЩФ, свойства, оценку общей выживаемости в этой группе больных провели с учетом результатов определения СТХ в ближайшие к возникновению метастазов сроки. В соответствии с кривыми выживаемости (рис.

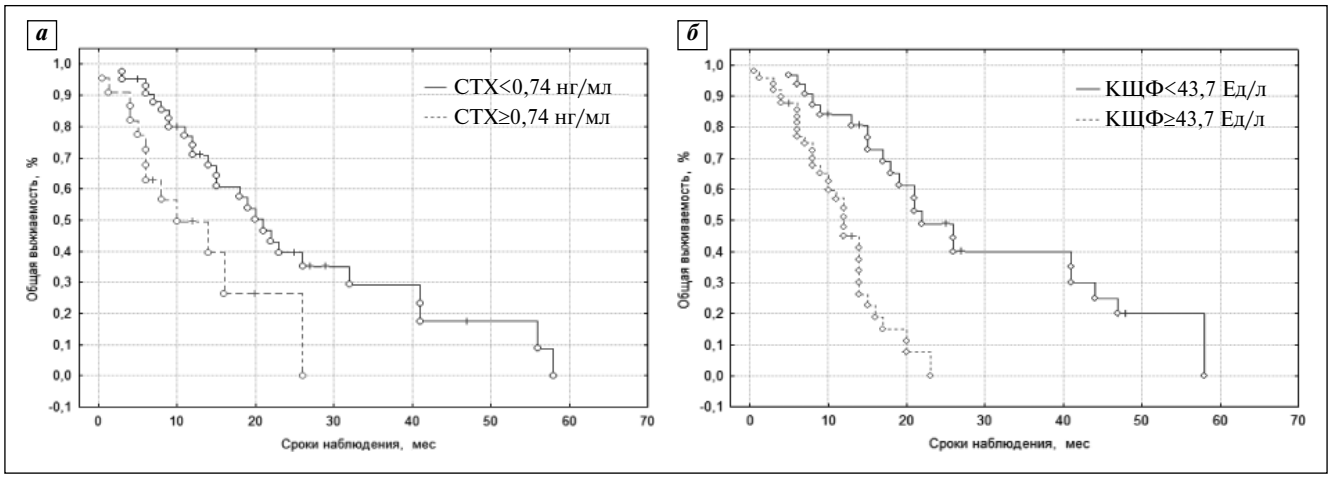

Рис. 1. *Общая выживаемость больных РМЖ с метастазами в костях (%) в зависимости от уровня СТХ (а) и КЩФ (б)*

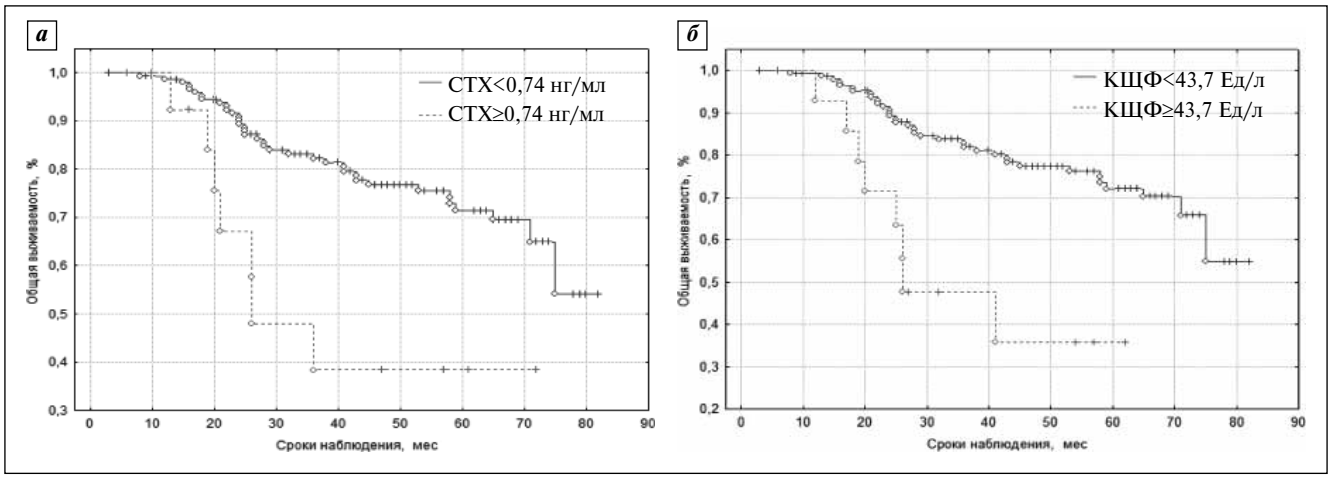

Рис. 2. *Общая выживаемость больных РМЖ без метастазов в костях (%) в зависимости от уровня CTX (а) и КЩФ (б)*

3) 5-летняя общая выживаемость пациенток с высоким уровнем CTX была нулевой, тогда как при нормальных значениях показателя она составила 55,5% (p<0,05). При этом медиана выживаемости пациенток с повышенными уровнями CTX, отражающими усиленный остеолиз, была достоверно (p<0,05) ниже (20,5 мес), чем у больных с нормальным остеолизом (40,1 мес).

Данные о выживаемости больных с учетом результатов определения показателей в отдельности послужили основанием для подобного анализа при одновременно неблагоприятных и благоприятных сочетаниях CTX и КЩФ. Оказалось, что 3-летняя выживаемость до прогрессирования опухолевого процесса у больных РМЖ с метастазами в костях при сочетании неблагоприятных показателей составила 6,3%, в то время как при повышенном уровне CTX она была нулевой. При этом медиана выживаемости при одновременно повышенных значениях обоих показателей (4,5 мес) практически не отличалась от медианы, рассчитанной с учетом CTX (4,8 мес).

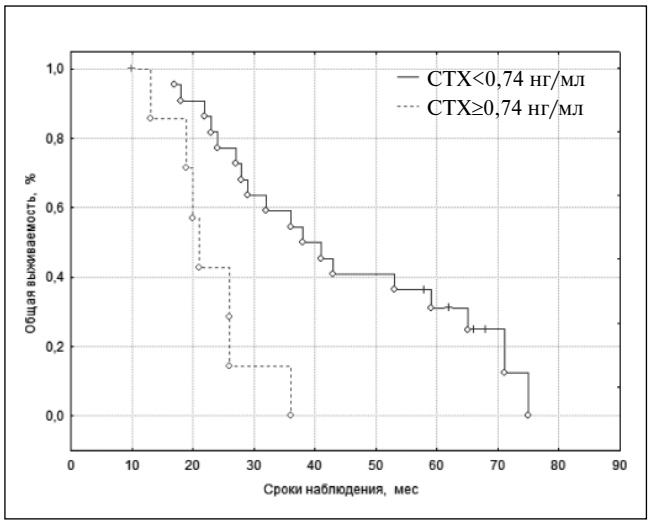

Рис. 3. *Общая выживаемость больных РМЖ (%) с развившимися в период наблюдения метастазами в зависимости от уровня CTX*

Таким образом, у больных с поражением скелета CTX наиболее тесно связан с выживаемостью до прогрессирования, поскольку дополнительное определение КЩФ не влияло на показатели выживаемости при неблагоприятном сочетании маркеров.

При многофакторном анализе, включавшем основные клинико-морфологические характеристики РМЖ (стадирование по системе Всемирной организации здравоохранения, клеточная дифференцировка и степень злокачественности опухоли, эффективность первичного лечения, рецепторный статус опухоли, скелетные осложнения) и уровни биохимических показателей костного метаболизма, доказано, что CTX является независимым фактором прогноза развития костных метастазов наряду с таким клиническим фактором, как степень злокачественности опухоли. Многофакторный анализ с учетом одновременного исследования CTX и КЩФ показал, что у больных РМЖ с поражением скелета общую выживаемость, как и выживаемость без прогрессирования, определяли стадия заболевания (p=0,006) и сочетание благоприятных или неблагоприятных уровней биохимических показателей (p=0,004). CTX и КЩФ (p=0,00002) при их совместном анализе определяли вероятность и сроки развития метастазов у больных РМЖ без их клинических признаков наряду с основным клиническим признаком – клеточной дифференцировкой опухоли (p=0,000001).

Следует отметить, что полученные нами результаты согласуются с опубликованными в последнее время работами зарубежных авторов, в которых отражено прогностическое значение маркеров костной резорбции C- и N-концевых телопептидов коллагена 1-го типа у больных с поражением скелета при злокачественных новообразованиях различной локализации [3, 4, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что оценка состояния костного ремоделирования на основе изучения СТХ и КЩФ в сыворотке крови больных РМЖ имеет прогностическое значение не только в отношении дальнейшего течения болезни, но и для прогноза жизни. У больных с высокими биохимическими показателями значительно раньше возникали скелетные осложнения, резко ухудшающие качество жизни и в целом показатели общей выживаемости.

В этой связи можно добавить, что одним из практических аспектов установленной нами закономерности может быть индивидуализация назначения бифосфонатов, в частности, в виде интенсификации лечения при высоких уровнях маркеров костного метаболизма. Взаимосвязь биохимических маркеров между собой и с клиническими характеристиками метастатического процесса делает возможным их использование в прогнозе поражения скелета и индивидуализации лечения больных РМЖ.

Проведенный многофакторный анализ установил прогностическую значимость СТХ и КЩФ наряду с важными клинико-морфологическими характеристиками злокачественных опухолей молочной железы. Полученные результаты с учетом наибольшей значимости СТХ послужили основанием для включения показателя остеолиза в алгоритм обследования больных РМЖ с целью повышения точности диагностики ранних костных метастазов, оценки прогноза и оптимизации тактики применения бифосфонатов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Любимова Н.В., Пашков М.В., Кожарская Г.В. и др. Значение биохимических маркеров костного метаболизма при поражении скелета у больных раком молочной и предстательной желез. Сибирский онкологический журнал. 2006; 3: 116–117. (Lyubimova N.V., Pashkov M.V., Kozarskaya G.V. Value of biochemical markers of bone metabolism in breast and prostate cancer patients with skeletal metastases. Siberian J. of Oncology. 2006; 3: 116–7 (in Russian))
2. Семенов Н.Н., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Личиницер М.Р. С-концевой телопептид коллагена I типа в моче – фактор прогноза при метастатическом поражении скелета у больных раком молочной железы. Технологии живых систем. 2012; 9 (3): 3–7. (Semenov N.N., Lyubimova N.V., Kushlinskii N.E., Lichinitcer M.R. C-terminale-telopeptide of type I collagen in urine of patients with breast cancer – prognostic factor of bone metastases. Technologies of living systems. 2012; 9 (3): 3–7 (in Russian))
3. Ali S.M., Demers L.M., Leitzel K. et al. Baseline serum NTx levels are prognostic in metastatic breast cancer patients with bone-only metastasis. Ann. Oncol. 2004; 15: 455–9.
4. Brown J.E., Thomson C.S., Ellis S.P. et al. Bone resorption predicts for skeletal complications in metastatic bone disease. Br. J. Cancer. 2003; 89: 2031–7.
5. Chirgwin J.M., Guise T.A. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. Crit Rev Eukaryot Expr. 2000; 10 (2): 159–78.
6. Coleman R.E., Major P., Lipton A. et al. Predictive Value of Bone Resorption and Formation Markers in Cancer Patients With Bone Metastases Receiving the Bisphosphonate Zoledronic Acid. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 4925–35.
7. Costa B.L., Demers L.M., Gouveia-Oliveira A. et al. Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I Cross-Links N-telopeptide and C-telopeptide in predicting bone metastases status. J. of Clinical Oncology. 2002; 20 (3): 850–6.
8. Demers L., Costa L., Lipton A. Biochemical marker and skeletal metastases. Clin. Orthop. 2003; 415: 138–47.
9. Löftner D., Richter A., Geppert R. et al. Normalization of biochemical markers of bone formation correlates with clinical benefit from therapy in metastatic breast cancer. Anticancer Res. 2003; 23 (2A): 1017–26.
10. Pectasides D., Nikolaou M., Farmakis D. et al. Clinical Value of Bone Remodelling Markers in Patients with Bone Metastases Treated with Zoledronic Acid. Anticancer Res. 2005; 25: 1457–63.

Поступила 26 мая 2014 г.

Новости науки

МОЛОКО ДЛЯ ВСКАРМЛИВАНИЯ РАЗНОПОЛОГО ПОТОМСТВА РАЗЛИЧНО ПО КАЧЕСТВЕННОМУ И КОЛИЧЕСТВЕННОМУ СОСТАВУ

Молоко, которым кормят своих детей обезьяны, различно по составу в зависимости от пола потомства – это установил в 2009 г. биолог Гарвардского университета Katie Hinde. В 2014 г. в журнале PlosOne опубликованы данные о составе молока коров, отелившихся бычком или телочкой. Оказалось, что количество молока, производимого коровой для вскармливания телочек, примерно на 1,6% больше, чем для вскармливания бычков. Качественный состав молока тоже различен – это касается как содержания кальция (в молоке «для девочек» его значительно больше), так и уровня кортизола. На каком этапе формируется это различие (на уровне вынашивания плода или позже), пока неизвестно. При исследовании состава грудного молока у человека было обнаружено, что молоко «для мальчиков» более насыщено белками и жирами, а молоко «для девочек» менее калорийно, но продуцируется в большем количестве.

PLoS One. 2014 Feb 3;9(2):e86169. doi: 10.1371/journal.pone.0086169. eCollection. – 2014.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 615.277.3:547.96].076.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ХИМЕРНОГО ПЕПТИДА P16_ANTP *IN VIVO*

Т.М. Кулинич, кандидат медицинских наук,
А.Н. Болдырев, **В.К. Боженко**, доктор медицинских наук, профессор
Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России,
Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д. 86
E-mail: sobral@mail.ru

Введение. *Белок P16INK4a играет одну из ключевых ролей в процессах контроля пролиферации клетки, его инактивация – одно из наиболее частых событий при новообразованиях различной локализации. Восстановление функции P16INK4a в неопластических клетках может способствовать торможению их деления и элиминации. Поиск искусственно синтезированных, функционально активных, коротких фрагментов белка p16 и методов их внутриклеточной доставки – актуальная задача современной таргетной терапии злокачественных новообразований.*

Цель исследования. *Изучение в экспериментах in vivo противоопухолевой активности последовательности 82–102 из белка P16INK4a в составе химерного пептида, в котором в качестве вектора для внутриклеточной доставки используется последовательность ANTP.*

Методы. *Исследование противоопухолевой активности последовательности p16_ANTP проведено на 40 мышах-самках Balb/c nude 8 нед массой тела 20–22 г, которым были перевиты штаммы опухолевых линий человека HCT-116 и A549. Мышам контрольных групп вводили физиологический раствор; животным опытных групп вводили пептид p16_ANTP в дозе 5 мг/кг в область опухолевого узла. Объем опухолевых узлов вычисляли по произведению величин 3 взаимно перпендикулярных диаметров.*

Результаты. *Местное введение химерного пептида p16_ANTP вызывает достоверное торможение роста экспериментальных моделей колоректального рака (HCT-116) и карциномы легкого человека (A549) соответственно на 66,8 и 58,7%.*

Заключение. *Химерный пептид p16_ANTP, включающий функциональную часть – фрагмент p16INK4A и интернализуемый вектор Antennapedia, обладает выраженной противоопухолевой активностью.*

Ключевые слова: *p16INK4a, ингибиторы циклиновых киназ, интернализуемые пептиды (CPP), противоопухолевая таргетная терапия*

RESEARCH OF ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF CHIMERIC PEPTIDE P16_ANTP IN VIVO

T.M. Kulinich, A.N. Boldyrev, V.K. Bozhenko
Russian Scientific Center of Reontgen Radiology, Profsoyuznaya Str., 86, Moscow, Russian Federation, 117997

Introduction. *P16INK4a protein plays one of the key role in processes of cell proliferation, its inactivation is noted in a number of tumors of various localization. Restoration of the p16INK4a function in neoplastic cells may promote braking of division of tumor cells and their elimination. The search of artificially synthesized, functionally active, short fragments of protein p16 and methods fot their intracellular delivery is an actual problem of modern tumor target therapy.*

The aim of the study. *In vivo research of antineoplastic activity of the sequence 82-102 from P16INK4a protein as a part of the chimeric peptide, which includes the sequence of ANTP as a vector for intracellular delivery.*

Methods. *Antitumor effect in vivo was investigated on xenograft models of HCT116, A-549 (concentration p16_ANTP – 5 mg/kg, using a thrice weekly dosing schedule). 40 mice females of Balb/c nude, at the age of 8 weeks, with a body weight of 20-22 g were used. The volume of tumors was calculated according to the product of values of 3 mutually perpendicular diameters of nodes.*

Results. *Intratumoral introduction of chimeric p16_ANTP peptide leads to the reliable growth inhibition on experimental human tumor models – colorectal cancer (HCT-116) and lung carcinoma (A549) by 66,8% and 58,7% accordingly.*

Conclusion. *The chimeric p16_ANTP peptide which includes functional part – 82-102 fragment of p16INK4A and an internalizing vector of Antennapedia, possesses the expressed antineoplastic activity.*

Key words: *p16INK4a, inhibitors cyclin of kinases, cell penetrating peptides (CPP), antitumor target therapy*

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных биологических функций гена p16INK4A и его продукта – белка P16 является регулирование клеточного цикла, он блокирует переход из G1- в S-фазу по pRb-зависимому механизму, ингибируя активность циклинзависимых киназ D-типа (cdk-4 и cdk-6) [1]. Показано, что в злокачественных новообразованиях различных локализаций (злокачественные лимфомы, рак поджелудочной железы, глиомы, меланомы и др.) ген p16 инактивирован [2]. Его инактивация может осуществляться различными путями, описаны как мутации, приводящие к нарушению функционирования белка, так и эпигенетические механизмы –

гиперметилирование промоторов и др. [2, 3]. Выключение гена p16 из процессов контроля клеточной пролиферации является одним из ключевых механизмов запуска канцерогенеза для клеток таких тканей, как эпителий поджелудочной железы, легких, эпидермис и др. [1, 3]. Показано, что восстановление активности гена p16 в опухолевых клетках приводит к остановке клеточного деления и их элиминации [4, 5]. Имеются также данные об участии p16 в процессах ангиогенеза во время роста опухоли. Показано [6], что внесение в клетки линий глиом последовательности p16 вызывает угнетение экспрессии васкулярного эндотелиального фактора, который является одним из важнейших медиаторов опухолевого ангиогенеза [6]. Ch.-T. Lee и соавт. [7] приводят данные о наличии противоопухолевого эффекта у конструкции p16 – аденовирус относительно линий рака мочевого пузыря человека, перевитой крысам [7].

В ряде работ показано, что связывать и ингибировать циклиновые киназы способны не только полноразмерные белки, но и фрагменты белка p16. Так, R. Fahraeus и соавт. [8] проанализировали циклинингибирующие свойства 20-аминокислотных последовательностей из белка p16 и показали, что фрагмент 82–102 обладает такими же киназ-ингибирующими свойствами, что и полноразмерный белок [4, 8]. Использование коротких функциональных фрагментов белков может иметь ряд преимуществ по сравнению с полноразмерным белком. Можно предположить, что короткая функциональная аминокислотная последовательность не будет содержать участков полноразмерного белка, ответственных за взаимодействие с другими белками-участниками функциональной цепи, а значит, не будет подвержена возможным нежелательным регуляторным воздействиям [8].

Ранее мы показали, что химерная последовательность p16INK4a_Antennapedia (P16_ANTP), включающая фрагмент p16 (82–102) и интернализуемый пептид Antennapedia, обладает выраженными цитостатическими и цитотоксическими свойствами относительно различных перевиваемых опухолевых линий и первичных культур опухолей человека, полученых из операционного материала. Было показано, что данный пептид *in vitro* вызывает остановку клеточного деления и индуцирует апоптоз [9, 10]. Отметим, что, несмотря на большой срок, прошедший после открытия эффективности ингибирования циклиновых киназ фрагментом белка p16 (82–102), публикаций по исследованию его противоопухолевой активности как *in vitro*, так и *in vivo* практически нет. Можно привести лишь единичные исследования. Так, R. Hosotani и соавт. [11] на моделях рака поджелудочный железы линий AsPC-1 и BxPC-3, перевитых интраперитонеально мышам, исследовали терапевтический эффект фрагмента p16, включающего фрагмент 82–102 и вектор Antennapedia. Было показано, что интраперитонеальное введение синтетического пептида вызывает резкое торможение роста опухоли, гибель опухолевых клеток по пути апоптоза, более длительное выживание опытных мышей [11]. Следует также отметить большое число публикаций по изучению противоопухолевого эффекта полноразмерного белка p16, в которых используется технология генной терапии [12].

Цель настоящей работы – исследование противоопухолевой активности последовательности 82–102 из белка p16INK4a в составе химерного пептида, в котором в качестве вектора используется последовательность ANTP, в экспериментах *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование противоопухолевой активности химерного пептида P16_ANTP проведено на модели колоректального рака HCT116. Последовательность P16_ANTP была получена методом твердофазного синтеза, как описано ранее [1].

В исследовании использовали 20 мышей-самок Balb/c nude в возрасте 8 нед, массой тела 20–22 г, разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Мыши были разделены на равные группы. Все исследования *in vivo* выполняли в соответствии с действующими в РФ методическими указаниями [13].

Штамм HCT-116 получен из Коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ. Опухолевый штамм был привит мышам обеих групп в количестве около 1 млн клеток на 1 мышь, подкожно на наружную поверхность заднего правого бедра. Животным опытной группы вводили пептид P16_ANTP в дозе 5 мг/кг в область опухолевого узла. Всего было сделано 11 инъекций пептида. 1-я инъекция осуществлена на 6-й день после перевивки опухолевых клеток, далее препарат вводили через сутки. Исследуемый препарат: пептид P16_ANTP для введения мышам *ex tempore* разводили в физиологическом растворе. Мыши контрольной группы получали физиологический раствор в эквивалентных объемах.

Оценка противоопухолевого эффекта. Объем опухолевых узлов вычисляли по произведению величин 3 взаимно перпендикулярных диаметров. О переносимости воздействия инъекций судили по состоянию и поведению мышей с опухолью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе на 28-й день эксперимента средний объем опухолей составил 679 мм^3, за время эксперимента погибли 3 мыши. В опытной группе опухолевые узлы росли медленнее, чем в контроле (рис. 1). На 28-й день эксперимента средний объем опухолей составил 225,4 мм^3, что соответствует 33,2% от такового в контрольной группе. В опытной группе погибли 2 мыши. Достоверных различий в выживаемости за время наблюдения не выявлено. Признаков токсического воздействия исследуемого препарата P16_ANTP в опытной группе мышей не отмечалось.

На рис. 2 показан сравнительный вид опухоли в контрольной и экспериментальной группах после 7 инъекций исследуемого пептида. Отмечается заметное уменьшение опухолевого узла в опытной группе.

Таким образом, показано, что местное введение химерного пептида P16_ANTP обусловливает достоверное (66,8%) торможение роста экспериментальной модели колоректального рака человека.

Исследование противоопухолевой активности химерного пептида P16_ANTP на модели карциномы легкого A549. Использовали 20 мышей-самок Balb/c nude 8 нед, массой тела 20–22 г, разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для постановки эксперимента животные были разделены на 2 группы по 10 мышей.

Штамм карциномы легкого A549 получен из Коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Животным опытной и контрольной групп были перевиты опухолевые клетки линии A549 в количестве 1 млн клеток на 1 мышь,

Рис. 1. *Динамика изменения объема опухоли – колоректального рака человека HCT116 у мышей Balb/C nude при подкожной перевивке в область правого заднего бедра (представлены значения средних и стандартной ошибки). Красная линия – контроль; зеленая – опытная группа, получавшая пептид p16_ANTP. Доза – 5 мг/кг, через день, начиная с 6-го дня после перевивки. Введение местное – в ложе опухоли*

Рис. 3. *Динамика изменения объема опухоли – рак легкого человека A549 у мышей Balb/C nude при подкожной перевивке в область правого заднего бедра (показаны значения средних и стандартной ошибки). Красная линия – контроль; зеленая – опытная группа, получавшая пептид p16_ANTP. Доза – 5 мг/кг, через день, начиная с 6-го дня после перевивки. Введение местное – в ложе опухоли*

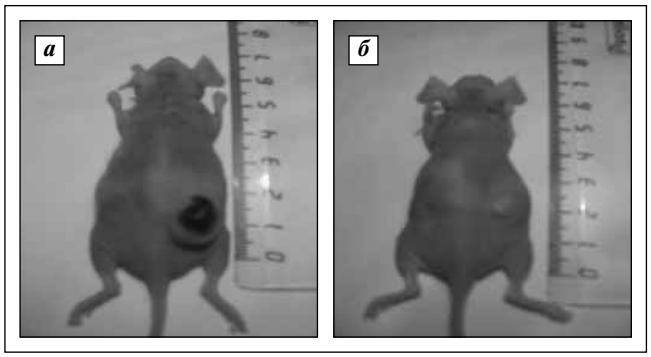

Рис. 2. *Типичная картина роста опухоли HCT116 у мышей Balb/C nude на 18-й день после перевивки: а – мышь №7 из контрольной группы (опухоль 11,5×13,5 мм); б – мышь №12 из опытной группы (опухоль 4,5×4,5 мм), с введением пептида p16_ANTP в ложе опухоли (проведено 7 инъекций)*

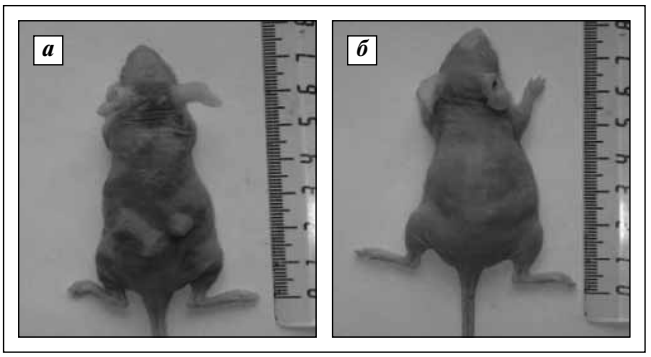

Рис. 4. *Типичная картина роста опухоли A549 у мышей Balb/C nude на 16-й день после перевивки: а – мышь №5 из контрольной группы (опухоль 6,0×7,0 мм); б – мышь №16 из экспериментальной группы (опухоль 3,0×3,0 мм) с введением пептида p16_ANTP в ложе опухоли (проведено 7 инъекций)*

подкожно, на внешнюю поверхность правого заднего бедра мыши. Инъекции препарата начинали в зоны опухолевых узлов на 4-е сутки после трансплантации и образования пальпируемой опухоли. Мыши контрольной группы получали физиологический раствор в объемах, эквивалентных объемам вводимого в опытной группе исследуемого пептида. Доза пептида P16_ANTP в опытной группе составляла 5 мг/кг. Было сделано 11 инъекций пептида. Исследуемый пептид P16_ANTP для введения мышам *ex tempore* разводили в физиологическом растворе. Инъекции проводили 1 раз в 2 дня.

Сравнительный анализ динамики роста опухоли показал, что в опытной группе на 6-й день после начала введения пептида наблюдали заметное снижение объема опухолей по сравнению с контролем (рис. 3). Средний объем опухолей у мышей контрольной группы на 24-й день эксперимента составил 95,24 мм^3. В опытной группе средний объем опухолей составил 39,29 мм^3, что соответствует 41,2% объема опухолей в контрольной группе. В обеих группах за время проведения эксперимента погибло по 1 животному.

Таким образом, показано (рис. 4), что местное введение химерного пептида P16_ANTP обусловливает достоверное (58,7%) торможение роста экспериментальной модели карциномы легкого A549.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что пептид P16_ANTP при местном введении проявляет выраженную противоопухолевую активность in vivo. Показано достоверно значимое уменьшение размеров опухолевых узлов как для HCT116, так и для A549 в среднем соответственно на 66,8 и 58,7%. Использование пептида P16_ANTP в качестве противоопухолевого препарата в разовой дозе 5 мг/кг не вызывает видимых токсических эффектов. Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности дальнейшего исследования противоопухолевых свойств химерного пептида, включающего циклинингибирующую последовательность белка P16INK4a.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dai L., Liu Y., Liu J., Wen X., Xu Z., Wang Z., Sun H., Tang S., Maguire A.R., Quan J., Zhang H., Ye T. A novel cyclinE/cyclinA-CDK inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: implications in cancer therapy. Cancer Lett. 2013; 333 (1): 103–12.
2. Cecchini M.J., Thwaites M., Talluri S., Macdonald J.I., Passos D.T., Chong J.L., Cantalupo P., Stafford P., Sáenz-Robles M.T., Francis S.M., Pipas J.M., Leone G., Welch I., Dick F.A. A retinoblastoma allele that is mutated at its common E2F interaction site inhibits cell proliferation in gene targeted mice. Mol. Cell Biol. 2014; Mar. 24
3. Fang X., Jiang Z., Peng J., Yao N., Fang X., Zheng S. Proliferative and invasive effects of inhibitors of kinase 4(P15(ink4b) and P16(ink4a)/CDKN2) gene activation on RKO human colorectal cancer cells. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi. 2014; 17 (1): 31–5.
4. Radulescu R.T., Fahraeus R. Targeting the RB pathway for cancer therapy: peptide mimetic foundations and promise. Am. J. Transl. Res. 2010; 2 (2): 209.
5. Shapiro G.I., Rodon J., Bedell C., Kwak E.L., Baselga J., Braña I., Pandya S.S., Scheffold C., Laird A.D., Nguyen L.T., Xu Y., Egile C., Edelman G. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245408 (XL147), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Clin. Cancer Res. 2014; 20 (1): 233–45.
6. Hironobu Harada, Kou Nakagawa, Shinji Iwata, Masahiro Saito, Yoshiaki Kumon, Saburo Sakaki, Kohji Sato, Katsuyuki Hamada. Restoration of Wild-Type p16 Down-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Inhibits Angiogenesis in Human Gliomas. Cancer Res. 1999; 1 (59): 3783–9.
7. Choon-Taek Lee, Ja Young Seol, Kyung-Ho Park, Chul-Gyu Yoo, Young Whan Kim, Curie Ahn, Yeong-Wook Song, Sung Koo Han, Jin Suk Han, Suhnggwon Kim, Jung-Sang Lee, Young-Soo Shim. Differential Effects of Adenovirus-p16 on Bladder Cancer Cell Lines Can Be Overcome by the Addition of Butyrate1. Clin. Cancer Res. 2001; 7: 210–4.
8. Fåhraeus R., Paramio J.M., Ball K.L., Lain S., Lane D.P. Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide derived from p16CDKN2/INK4A. Current Biology. 1996; 6 (1): 84–91.
9. Боженко В.К., Кулинич Т.М., Иванов А.В., Кудинова Е.А., Шишкин А.М, Харченко В.П. Исследование влияния интернализуемого пептида p16INK4A на краткосрочные культуры опухолей человека. Вопросы онкологии. 2009; 55 (4): 451–4.
(Bozhenko V.K., Kulinich T.M., Ivanov A.V., Kudinova E.A., Shishkin A.M., Kharchenko V.P. Effect of metabolizable peptide p16INK4a on short-lived human tumor cultures. Voprosi Onkologii. 2009; 55 (4): 451–4 (in Russian))
10. Кулинич Т.М., Харченко В.П., Филясова Е.И., Шишкин А.М., Боженко В.К. Цитостатические и цитотоксические свойства химерных пептидов, содержащих циклинингибирующие фрагменты. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008; 145 (1): 37–40.
(Kulinich T.M., Kharchenko V.P., Filyasova E.I., Shishkin A.M., Bozhenko V.K. Cytostatic and cytotoxic properties of chimeric peptides containing cyclin-inhibiting fragments. Bull. Exp. Biol. Med. 2008; 145 (1): 37–40 (in Russian))
11. Ryo Hosotani, Yoshiharu Miyamoto, Koji Fujimoto, Ryuichiro Doi, Akira Otaka, Nobutaka Fujii, Masayuki Imamura. Trojan p16 Peptide Suppresses Pancreatic Cancer Growth and Prolongs Survival in Mice. Clin. Cancer Res. 2002; 8: 1271–6.
12. Wing Cheong Lee Andrew, Li Jian-Hua, Shi Willa, Li Anna, Liu Emily Ng, Ta-Jen, Henry J. Klamut, Fei-Fei Liu. P16 Gene therapy: A potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma. Mol. Cancer Ther. 2003; (2): 961–9.
13. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андронова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под общей редакцией чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп.) 2005; 637–51.
(Treshalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.B., Garin A.M. Methodical instruction on investigation of antitumor activity of pharmacological substances. In: Guidance on experimental (pre-clinical) investigation new pharmacological substances (ed. Chabriev R.U.-2d ed.). 2005; 637–51 (in Russian))

Поступила 14 мая 2014 г.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 616.71-006.04-078.33

ИНТЕРЛЕЙКИН 16 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С НОВООБРАЗОВАНИЯМИ КОСТЕЙ

И.В. Бабкина, доктор медицинских наук, профессор,
Ю.С. Тимофеев, **Е.А. Тен**, **Д.В. Рогожин**, кандидат медицинских наук,
Ю.Н. Соловьев, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
Е.Ю. Руссо, **З.Г. Кадагидзе**, доктор медицинских наук, профессор

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: docbabkina@rambler.ru

Введение. *Прогресс в лечении онкологических заболеваний (и опухолей костей в том числе) связан с существенным прорывом в молекулярной биологии, иммунологии, в понимании причин возникновения опухолевой клетки, закономерностей развития опухолевого процесса и течения заболевания.*

Цель исследования. *Изучение уровня интерлейкина (IL) 16 в сыворотке крови пациентов с опухолями костей до начала специфического лечения с учетом гистологического строения новообразования и в сравнении с отдаленными результатами лечения.*

Методы. *Иммуноферментный анализ.*

Результаты. *Частота выявления IL16 в сыворотке крови при новообразованиях костей составила 93%, достоверных различий в уровне IL16 с учетом гистологического строения новообразования и стадии заболевания при злокачественных опухолях не выявлено. Взаимосвязи между размером первичной опухоли и содержанием IL16 в сыворотке крови не обнаружено. Выявлены различия в показателях выживаемости больных с учетом содержания IL16 в сыворотке крови, определенных до начала специфического лечения. Общая 5-летняя выживаемость при остеогенной саркоме у пациентов с содержанием IL16 в сыворотке крови >33,0 пг/мл была ниже в 1,6 раза, при саркоме Юинга – в 1,7 раза, при хондросаркоме – в 1,8 раза, чем у пациентов с содержанием IL16 в сыворотке крови <33,0 пг/мл.*

Заключение. *Полученные результаты могут быть использованы для планирования последующих исследований по выявлению факторов прогноза и эффективности лечения злокачественных опухолей костей.*

Ключевые слова: *остеосаркома, хондросаркома, саркома Юинга, IL16*

INTERLEUKIN 16 IN THE SERUM BONE

I.V. Babkina, Yu.S. Timofeev, E.A. Ten, D.V. Rogozin, Yu.N. Soloviev, E.Yu. Russo, Z.G. Kadagidze
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478

Introduction. *Progress in the treatment of cancer and bone tumors including, is associated with a significant breakthrough in molecular biology, immunology, understanding the causes of the emergence of the tumor cell, patterns of the development and course of the tumor process.*

The aim of the study. *The study of the levels of interleukin (IL) 16 in the serum of patients with bone tumors prior to treatment with a particular account of the histological structure of the tumor and late fate of the treatment*

Methods. *Immunoassay.*

Results. *The detection rate of IL16 in serum of the patients with bone tumors was 93%, no significant differences in levels of IL16 if considering the histological structure of tumor and stage malignant tumors were found. No relationship between the size of the primary tumor and the content of IL16 in serum was revealed. Differences in survivability rates of patients with regard to the content in the IL16 serum levels were determined before the beginning of a particular treatment. Overall 5-year survival value of osteosarcoma patients with the content of IL16 in serum >33,0 pg/ml was 1,6 times, with Ewing's sarcoma – 1,7 times, while in chondrosarcoma – 1,8 times less than in patients with IL16 content in the blood serum <33,0 pg/ml.*

Conclusion. *The results can be used to plan further research to identify factors for the prediction of the efficacy of the treatment of malignant bone tumors.*

Key words: *osteosarcoma, chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, IL16*

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс в лечении онкологических заболеваний (и опухолей костей в том числе) связан с существенным прорывом в молекулярной биологии, иммунологии, в понимании причин возникновения опухолевой клетки и закономерностей развития опухолевого процесса. Результатом станет появление лекарственных препаратов направленного действия, способных влиять на экспрессию биологически активных веществ данной конкретной опухоли [1]. Создание и успешное применение специфических молекулярно-направленных (таргетных) препаратов существенно

повысили эффективность лечения некоторых онкологических заболеваний, в частности, рака молочной железы. Однако, как показал опыт, неоадъювантная и адъювантная химиотерапия сопровождается рядом побочных эффектов.

Другая проблема подбора нужного препарата – резистентность, которая может быть естественной (изначальная нечувствительность опухоли к препарату) и приобретенной (появляется после первоначально успешного лечения). Большую роль в развитии приобретенной резистентности играет иммунная система, целью функционирования которой является контроль постоянства клеточного и гуморального иммунитета организма, уничтожение генетически чужеродных (опухолевых) клеток или своих с измененной структурой (эмбриональных, а также клеток, претерпевающих изменения в результате процессов старения, повреждения или возникающих в условиях нормального, физиологического функционирования организма). Решение проблем лекарственной устойчивости, открытие способов ее преодоления или использования невозможно без изучения как сложных генетических изменений в опухолевой клетке, так и защитных особенностей организма.

Процессы распознавания и уничтожения опухолевых или дефектных клеток осуществляются преимущественно локально, однако иммунокомпетентные клетки из места образования поступают в очаг с кровотоком. В свою очередь, из опухоли или очага воспаления при участии лимфатических и кровеносных сосудов в места образования иммунокомпетентных клеток поступают антигены и медиаторы, влияющие на их экспрессию. Таким образом, при исследовании крови можно получить информацию о работе иммунной системы и попытаться косвенно оценить эффективность борьбы организма с чужеродными антигенами при различных заболеваниях человека [2].

Нами изучено содержание интерлейкина (IL) в сыворотке крови больных с новообразованиями костей.

IL относятся к белкам, продуцируемым активированными клетками иммунной системы. Они ответственны за коммуникации между разными типами лейкоцитов. Наиболее типичный эффект – индукция пролиферации через мембранные рецепторы [2]. Мы уделили внимание изучению уровня IL16 в сыворотке крови у пациентов с опухолями костей до начала специфического лечения с учетом гистологического строения опухоли.

IL16 – член семейства провоспалительных цитокинов, первоначально был идентифицирован как фактор лимфоцитов в 1982 г. Он продуцируется активированными $CD8^+$ Т-клеток [3], тучных клеток [4] и В-клеток [5]. IL16 также называют проангиогенным цитокином, обладающим способностью стимулировать экспрессию факторов неоангиогенеза [6]. Показано, что IL16 участвует в процессах обмена веществ при раке почки [7], раке носоглотки [8], гепатоцеллюлярной карциноме [9].

IL16 может также способствовать секреции опухоль-ассоциированных воспалительных цитокинов (например, фактор некроза опухоли α – TNFα, IL1β, IL6, IL15) моноцитами [10]. Роль IL16 в онкогенезе была изучена при раке предстательной железы (РПЖ) [11], при этом наиболее высокий сывороточный уровень IL16 был обнаружен на последних стадиях заболевания [12, 13], отмечена корреляция между экспрессией IL16 в ткани РПЖ и стадией опухолевого процесса по шкале Глисона >7 баллов ($p<0,01$). Взаимосвязи этого цитокина с уровнем простатоспецифического антигена в сыворотке крови не выявлено. Многофакторный анализ показал, что уровень экспрессии IL16, количество баллов по шкале Глисона и стадия опухолевого процесса – независимые факторы прогноза безрецидивной выживаемости при РПЖ [14].

В одном из исследований авторы показали, что уровень IL16 у больных раком толстой кишки достоверно выше, чем у практически здоровых людей [15], связи между полиморфизмом гена IL16 и его уровнем в сыворотке крови не установлено. Полагали, что IL16 – важный маркер в диагностике, прогнозе и эффективности лечения, а также мишень для химиотерапии при множественной миеломе [16–18].

IL16 также называют проангиогенным цитокином, обладающим способностью стимулировать экспрессию факторов неоангиогенеза [6]. Показано, что IL16 участвует в процессах обмена веществ при раке почки [7] и носоглотки [8], при гепатоцеллюлярной карциноме [9].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами изучен уровень IL16 в сыворотке крови 134 больных (возраст пациентов – от 14 до 50 лет) с опухолями костей – доброкачественными (у 6), пограничными (гигантоклеточная опухоль кости) (у 22), злокачественными (у 106). Злокачественные новообразования были представлены остеогенной саркомой (45 случаев: типичная – у 35 больных, паростальная – у 6, периостальная – у 4), хондросаркомой (у 24), саркомой Юинга (у 27), злокачественной фиброзной гистиоцитомой (у 7), хордомой (у 3). Уровень IL16 определяли иммуноферментным методом в сыворотке крови больных до начала специфического лечения реактивами фирмы Biosource (США). Контрольную группу составили 10 практически здоровых людей соответствующего возраста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели IL16, отличные от 0, выявлены в образцах сыворотки крови 124 (93%) больных. Среднее содержание IL16 при доброкачественных опухолях костей составило 34,4±2,0 пг/мл и достоверно не отличалось от показателей у больных с пограничными (28,9±2,3 пг/мл) и злокачественными (33,0±1,8 пг/мл) опухолями костей. Различий в содержании IL16 в сыворотке крови с учетом морфологического строения опухоли при злокаче-

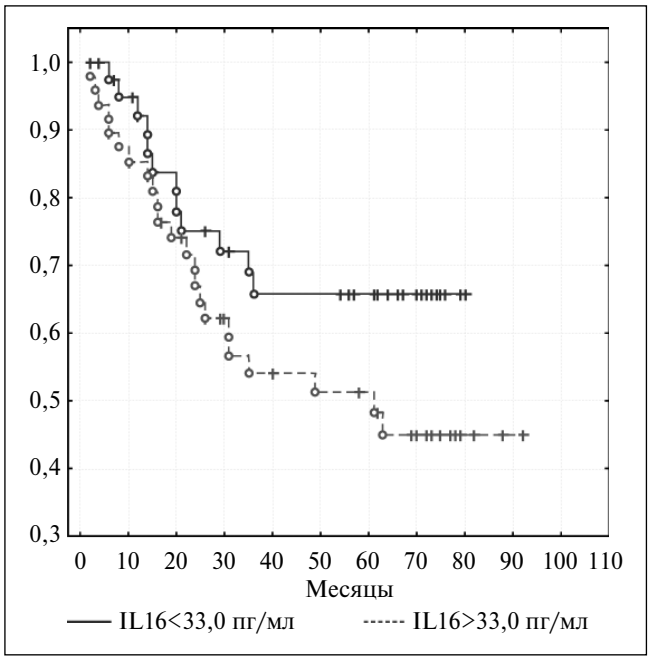

Рис. 1. *Кумулятивная общая выживаемость (по методу Каплана–Мейера) при злокачественных опухолях костей с учетом уровня IL16 в сыворотке крови*

ственных новообразованиях костей не выявлено. При периостальной остеогенной саркоме уровень IL16 был ниже, чем при типичном и паростальном ее вариантах (без статистически достоверных различий). Взаимосвязи между размером первичного новообразования и содержанием IL16 в сыворотке крови не обнаружено (r=0,38; p=0,94).

Анализ содержания IL16 в сыворотке крови с учетом стадии заболевания на момент обращения в клинику показал, что при IV стадии (9 больных) средние показатели были выше, чем при II стадии (57 больных) – соответственно 44,6±11,4 и 32,2±2,5 пг/мл. Однако при сравнении медиан при II и IV стадиях (соответственно 32,2 и 34,81 пг/мл), а также нижнего и верхнего квартилей различий не обнаружено. В целом статистический анализ достоверных различий не выявил (p=0,12).

Под нашим наблюдением в течение 6–92 мес находились 89 (83,9%) больных со злокачественными опухолями костей. За период наблюдения 35 (39,3%) пациентов умерли, 54 (60,7%) – живы. Общая кумулятивная 3-летняя выживаемость составила 60%, 5-летняя – 57%.

Нами проанализирована общая выживаемость пациентов с учетом содержания IL16 в сыворотке крови. Пациенты были разделены на 2 группы: в 1-ю включили больных (n=41) с уровнем IL16 ниже среднего (<33,0 пг/мл), во 2-ю (n=48) – с уровнем IL16 выше среднего (>33,0 пг/мл). В 1-й группе за период наблюдения умерли 12 (47,9%) больных, живы – 29 (70,7%); во 2-й умерли 23 (47,9%), живы – 25 (52,0%) пациентов. В 1-й группе кумулятивная общая 3-летняя выживаемость составила 69%, 5-летняя – 64%, во 2-й – соответственно 54 и 48% (рис. 1).

На следующем этапе исследования нами были проанализированы отдаленные результаты лечения с учетом гистологического строения опухоли и уровня IL16 в сыворотке крови. Пациенты были разделены на 3 группы с учетом гистологического строения новообразования: типичная остеогенная саркома (n=27), хондросаркома (n=19), саркома Юинга (n=27).

В группе больных остеогенной саркомой за период наблюдения умерли 11 (40,7%) пациентов, живы – 16 (59,2%). Разделение на подгруппы по содержанию IL16 в сыворотке крови проводили по ранее указанному принципу. В 1-й подгруппе (n=8) с содержанием IL16<33,0 пг/мл за период наблюдения умерли 2 (25%), живы – 6 (75%) пациентов, во 2-й подгруппе (n=19) с содержанием IL16>33,0 пг/мл умерли 9 (47,3%), живы – 10 (52,6%) больных. Ку-

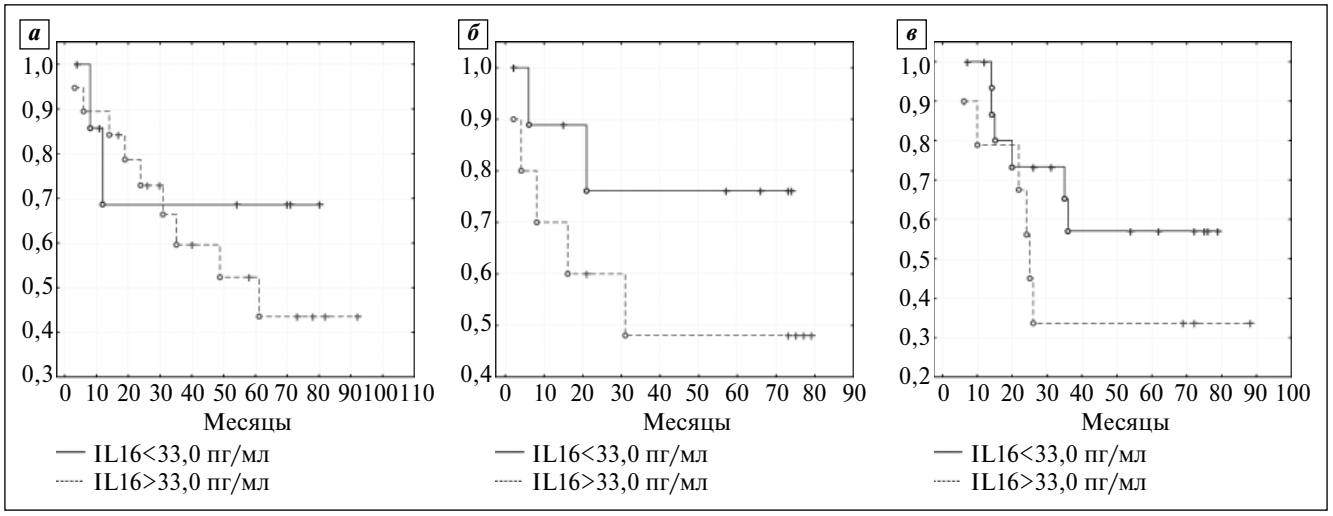

Рис. 2. *Кумулятивная общая выживаемость больных с учетом уровня IL16 в сыворотке крови: а – при типичной остеосаркоме; б – при хондросаркоме; в – при саркоме Юинга*

мулятивная общая 3- и 5-летняя выживаемость в 1-й подгруппе составила 69%; во 2-й подгруппе показатели 3- и 5-летней выживаемости были соответственно 58 и 44% (рис. 2а).

Среди больных хондросаркомой кости за период наблюдения умерли 7 (36,8%), живы – 12 (63,1%) пациентов. Разделение на подгруппы по содержанию IL16 в сыворотке крови показало, что в 1-й подгруппе (n=10) за период наблюдения умерли 2 (20%), живы – 8 (80%) больных, во 2-й (n=9) умерли 5 (55,5%), живы – 4 (44,4%) больных. У пациентов 1-й подгруппы кумулятивная общая 3- и 5-летняя выживаемость составила 77%, у больных 2-й подгруппы 3- и 5-летняя выживаемость была в пределах 42% (рис. 2б).

Среди больных саркомой Юинга за период наблюдения умерли 12 (44,4%), живы – 15 (55,5%). В 1-й подгруппе (n=17) с содержанием IL16<33,0 пг/мл за период наблюдения умерли 6 (35,2%), живы – 11 (64,7%) больных, во 2-й (n=10) умерли 6 (60%), живы – 4 (40%) пациента. В 1-й подгруппе кумулятивная общая 3- и 5-летняя выживаемость составила 58%; у больных 2-й подгруппы показатели 3- и 5-летней выживаемости составили 34% (рис. 2в).

Таким образом, частота выявления IL16 в сыворотке крови больных с новообразованиями костей составила 93%; достоверных различий в уровне цитокина с учетом гистологического строения опухоли не выявлено. Взаимосвязи между размером первичной опухоли и содержанием IL16 в сыворотке крови не обнаружено. Общая 3- и 5-летняя выживаемость больных со злокачественными опухолями костей при содержании IL16 в сыворотке крови >33,0 пг/мл была значительно ниже, чем у пациентов с более низким уровнем IL16. Общая 5-летняя выживаемость больных остеогенной саркомой с высоким содержанием IL16 в сыворотке крови была ниже в 1,6 раза, при саркоме Юинга – в 1,7 раза, при хондросаркоме – в 1,8 раза, чем у пациентов с содержанием IL16 в сыворотке крови <33,0 пг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо отметить, что частота выявления IL16 в сыворотке крови при новообразованиях костей составила 93%, достоверных различий в уровне IL16 с учетом гистологического строения новообразования и стадии заболевания не выявлено. Взаимосвязи между размером первичной опухоли и содержанием IL16 в сыворотке крови не обнаружено. Установлены различия в показателях выживаемости больных с учетом содержания IL16 в сыворотке крови до начала специфического лечения. Общая 5-летняя выживаемость больных остеогенной саркомой с содержанием IL16 в сыворотке крови >33,0 пг/мл была ниже в 1,6 раза, саркомой Юинга – в 1,7 раза, хондросаркомой – в 1,8 раза, чем у пациентов с содержанием IL16 в сыворотке крови <33,0 пг/мл.

Полученные результаты могут быть использованы для планирования последующих исследований по выявлению факторов прогноза и эффективности лечения злокачественных опухолей костей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mc Tiernan A., Jinks R.C., Sydes M.R. et al. Presence of chemotherapy-induced toxicity predicts improved survival in patients with localised extremity osteosarcoma treated with doxorubicin and cisplatin: a report from the European Osteosarcoma Intergroup. Eur. J. Cancer. 2012; 48 (5): 703–12.
2. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). Москва: Медицинская книга. Н.Новгород: Издательство НГМА. 2003. 443 с. (Lebedev K.A., Ponyakina I.D. Immune deficiency (detection and treatment). Moscow: Medical Book, Nizhny Novgorod: Publishing NGMA. 2003. 443 p (in Russia))
3. Laberge S., Cruikshank W.W., Kornfeld H., Center D.M. Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. J. Immunol. 1995; 155: 2902–10.
4. Rumsaeng V., Cruikshank W.W., Foster B. et al. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. J. Immunol. 1997; 159: 2904–10.
5. Sharma V., Sparks J.L., Vail J.D. Human B-cell lines constitutively express and secrete interleukin-16. Immunology. 2000; 99: 266–71.
6. Yellapa A., Bahr J.M., Bitterman P. et al. Association of interleukin 16 with the development of ovarian tumor and tumor-associated neoangiogenesis in laying hen model of spontaneous ovarian cancer. Int. J. Gynecol. Cancer. 2012; 22 (2): 199–207.
7. Zhu J., Qin C., Yan F. et al. IL-16 polymorphism and risk of renal cell carcinoma: association in a Chinese population. Int. J. Urol. 2010; 17 (8): 700–7.
8. Gao L.B., Liang W.B., Xue H. et al. Genetic polymorphism of interleukin-16 and risk of nasopharyngeal carcinoma. Clin. Chim. Acta. 2009; 409 (1–2): 132–5.
9. Li S., Deng Y., Chen Z.P. et al. Genetic polymorphism of interleukin-16 influences susceptibility to HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. Infect. Genet. Evol. 2011; 11 (8): 2083–8.
10. Mathy N.L., Scheuer W., Lanzend rfer M. et al. Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. Immunology. 2000; 100: 63–9.
11. Thomas G., Jacobs K.B., Yeager M. et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. Nat. Genet. 2008; 40: 310–5.
12. Koike M., Sekigawa I., Okada M. et al. Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. Leuk. Res. 2002; 26: 705–11.
13. Kovacs E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumour stage and previous therapy. Biomed. Pharmacother. 2001; 55: 111–6.
14. Compérat E., Rouprêt M., Drouin S.J. et al. Tissue expression of IL16 in prostate cancer and its association with recurrence after radical prostatectomy. Prostate. 2010; 70 (15): 1622–7.
15. Gao L.B., Rao L., Wang Y.Y. et al. The association of interleukin-16 polymorphisms with IL-16 serum levels and risk of colorectal and gastric cancer. Carcinogenesis. 2009; 2 (2): 295–9.
16. Atanackovic D., Hildebrandt Y., Templin J. et al. Role of interleukin 16 in multiple myeloma. J. Natl. Cancer Inst. 2012; 104 (13): 1005–20.
17. Mahindra A., Anderson K.C. Role of interleukin 16 in multiple myeloma pathogenesis: a potential novel therapeutic target? J. Natl. Cancer Inst. 2012; 104 (13): 964–5.
18. Moon M.H., Jeong J.K., Seo J.S. et al. Bisphosphonate enhances TRAIL sensitivity to human osteosarcoma cells via death receptor 5 upregulation. Exp. Mol. Med. 2011; 43 (3): 138–45.

Поступила 14 мая 2014 г.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 616.33-006.6-08-036.8-092:612.6.05]-07

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНА *TYMS* У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА, СВЯЗЬ С ОТДАЛЕННЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

М.В. Немцова[1, 2], доктор биологических наук, профессор,
А.А. Удилова[1], **Д.В. Залетаев**[1], доктор биологических наук, профессор,
Т.В. Хоробрых[1], доктор медицинских наук, профессор

[1]Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8;

[2]Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России, Российская Федерация, 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

E-mail: nemtsova_m_v@mail.ru

Введение. *Тимидилатсинтетаза (ТС), ключевой фермент биосинтеза нуклеотидов, является основной мишенью для 5-фторурацила (5-ФУ) при химиотерапии. Ген TYMS, кодирующий ТС, имеет несколько генетических полиморфизмов, расположенных в 5'- (R2/R3 и G>C) и 3'- (делеция 6 нуклеотидов) нетранслируемых областях, которые влияют на активность его экспрессии.*

Цель исследования. *Изучение полиморфизмов в 5'- и 3'- нетранслируемых областях гена TYMS у 80 больных с местнораспространенным раком желудка (РЖ), которым проведено хирургическое лечение с последующей химиотерапией 5-ФУ. Поиск взаимосвязи между генотипами, определенными у больных, и клинико-морфологическими характеристиками РЖ, а также отдаленными результатами комбинированного лечения.*

Методы. *Полимеразная цепная реакция с определением полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ).*

Результаты. *Показано, что у пациентов с генотипом 2R/2R на момент операции достоверно чаще встречается метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов (p=0,047). При сравнении групп пациентов с различными типами РЖ по классификации Лорен выявлено, что генотип -6/-6 достоверно чаще встречается при интестинальном типе РЖ по сравнению с диффузным (p=0,037), а также этот генотип достоверно чаще встречается у пациентов с высоко- и умеренно дифференцированными аденокарциномами (p=0,015). Мы не нашли ассоциации исследуемых полиморфизмов гена TYMS с размером опухоли, возрастом манифестации заболевания, месторасположением опухоли в желудке. При оценке отдаленных результатов лечения 5-ФУ выявлено, что генотип 3RG/3RG достоверно чаще (p=0,024) встречается в группе пациентов, у которых на фоне комбинированного лечения РЖ в течение 3 лет после операции возник рецидив заболевания (местный рецидив, канцероматоз брюшины, отдаленные метастазы). Генотип 2RG/3RC, напротив, достоверно чаще встречается в группе пациентов, у которых на фоне комбинированного лечения в течение 3 лет после операции не возникло рецидива заболевания (p=0,023).*

Заключение. *На клиническом материале подтверждена ассоциация полиморфизмов гена TYMS с эффективностью лечения 5-ФУ больных РЖ, что позволит использовать их в качестве дополнительных индивидуальных факторов прогноза и выявлять пациентов с низкой чувствительностью к 5-ФУ.*

Ключевые слова: рак желудка, тимидилатсинтетаза, полиморфизм, генотип, 5-фторурацил

TYMS GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER, THE RELATIONSHIP WITH LONG-TERM RESULTS OF COMBINED TREATMENT

M.V. Nemtsova[1, 2], A.A. Udilova[1], D.V. Zaletaev[1], T.V. Khorobrych[1]

[1]I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str., 8, Moscow, Russian Federation, 119991;
[2]Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya Str., 2/1, Moscow, Russian Federation, 123995

Introduction. *Thymidylate synthase (TS) is a key enzyme in nucleotide biosynthesis and is the main intracellular target of 5-FU. We investigated the clinical and prognostic importance of TYMS gene 5' (TSR2/TSR3 and G>C) and 3' (del 6) untranslated region polymorphisms for gastric cancer patients.*

The aim of the study. *We investigated the clinical and prognostic importance of TYMS polymorphisms for gastric cancer patients. We examined of 5' (TSR2/TSR3 and G>C) and 3' (del 6) untranslated region polymorphisms in 80 gastric cancer patients after surgical treatment and chemotherapy with 5-fluorouracil.*

Methods. *PCR-RFLP.*

Results. *We have shown, that the genotype 2R/2R is significantly more often found in patients with regional lymph node metastases (N1-3) (p=0,0475), genotype -6/-6 is significantly more common in patients with intestinal gastric cancer (p=0,0375), as well as in patients, who have high/moderately differentiated adenocarcinoma (p=0,033).*

In the study of the effectiveness of chemotherapy in 58 gastric cancer patients, we have shown, that genotype 3G/3G was associated with the poor prognosis, development of local recurrence, carcinomatosis, the appearance of distant metastases during the first 3 years after surgery and 5-FU treatment (p=0,024). Genotype 2G/3C was significantly frequent (p=0,023) in patients without progression of the disease within the first 3 years after surgery and 5-FU treatment. In the study of the TYMS gene 3'-untranslated region (del 6) polymorphism in the patients after surgical treatment and chemotherapy, we found no significant differences.

Conclusion. *We suggest that TYMS 5'UTR and 3'UTR polymorphisms can serve as individual prognostic factors and as predictors of adjuvant treatment effectiveness in patients with locally advanced gastric cancer.*

Key words: *thymidylate synthase, TYMS gene, polymorphisms, genotype, 5-FU chemotherapy*

ВВЕДЕНИЕ

В структуре онкологической заболеваемости России рак желудка (РЖ) занимает 2-е место после рака легкого у мужчин и 3-е – после рака молочной железы и меланомы у женщин. В России ежегодно выявляется 40–50 тыс. новых случаев заболевания [1]. При этом многие больные поступают на лечение с местнораспространенными или генерализованными формами опухолевого процесса, поэтому радикальность большинства операций носит условный характер, а отдаленные результаты хирургического лечения больных РЖ, за исключением начальных стадий, остаются неудовлетворительными. С учетом того, что неудовлетворительные результаты хирургического лечения при РЖ связаны с высокой частотой развития отдаленных метастазов и местного рецидива опухолевого процесса за первые годы наблюдения, больным проводится комбинированное лечение, включающее, помимо хирургических методов, еще химиотерапевтические препараты.

Выбор схем химиотерапии основывается на интуитивном подборе, без достаточного учета объективных показателей прогноза заболевания, молекулярно-генетических особенностей опухоли. Сегодня исследования показывают, что у больных, получающих адъювантную химиотерапию, имеется лишь небольшое преимущество в выживаемости перед показателем при хирургическом лечении [2].

Адъювантная химиотерапия РЖ обычно основана на производных фторпиримидинов, больным проводится монотерапия 5-фторурацилом (5-ФУ) или комбинация 5-ФУ (препаратов на его основе) с препаратами платины [3]. 5-ФУ является аналогом урацила с атомом фтора вместо водорода в позиции С-5, поэтому он легко проникает в клетку, используя те же механизмы, что и урацил. В клетке 5-ФУ преобразуется в несколько активных фторсодержащих метаболитов, которые включаются в РНК, нарушая ее синтез, а также ингибируют действие фермента тимидилатсинтетазы (ТС) [4].

В неизмененных клетках ТС катализирует восстановительное метилирование дезоксиуридина монофосфата (дУМФ) до дезокситимидина монофосфата (дТМФ), предоставляя единственный de novo источник тимидилата, который необходим для репликации и репарации ДНК. Ингибирование фермента приводит к истощению пула дТМФ и последующему снижению уровня дезокситимидина трифосфата (дТТФ), что вызывает количественные нарушения в содержании других дезоксинуклеотидов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ). Такие нарушения концентрации нуклеотидов приводят к проблемам синтеза и репарации ДНК, вызывая летальные изменения ДНК и гибель клетки. В результате снижения функции ТС происходит также накопление дУМФ, что приводит к повышению уровня дУТФ. Оба этих метаболита начинают неправильно включаться в ДНК, ингибируя репликацию и рост активно делящихся клеток [5].

Белок ТС является продуктом гена TYMS, расположенного на хромосоме 18 в 18p11.3. Снижение экспрессии ТС в опухолевых клетках приводит к цитотоксическому эффекту, а также усиливает цитотоксический эффект 5-ФУ. Доклинические исследования показали, что экспрессия ТС является ключевым фактором, определяющим чувствительность к 5-ФУ. Повышение экспрессии ТС с увеличением уровня мРНК и белка наблюдается в клеточных линиях, устойчивых к действию 5-ФУ и фтордезоксиуридина. При изучении экспрессии ТС у больных РЖ посредством иммуногистохимического анализа и обратной транскрипции (RT-PCR) показано улучшение ответа на терапию 5-ФУ у больных с низкой экспрессией ТС в опухоли. Таким образом, экспрессия ТС является прогностическим индикатором эффективности проводимого лечения [6, 7].

Показано, что в последовательности гена TYMS существует нескольких полиморфизмов, влияющих на активность его экспрессии [8] (рис. 1).

Промотор гена TYMS обычно имеет 2 (R2) или 3 (R3) тандемных повтора длиной в 28 пар оснований. Исследования показали, что при экспрессии гена,

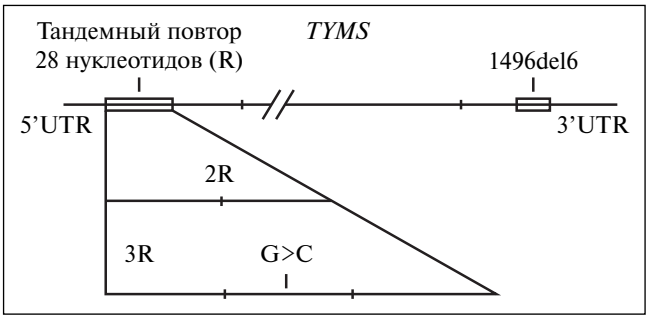

Рис. 1. *Полиморфизмы гена TYMS, ассоциированные с изменением экспрессии*

имеющего в промоторе 3 повтора, определяется почти в 3 раза больше белка и мРНК, чем при экспрессии гена, имеющего в промоторе 2 повтора [9]. Вероятно, поэтому пациенты, гомозиготные по R3/R3, хуже отвечают на химиотерапию 5-ФУ, чем пациенты с R2/R2 и R2/R3.

Выявлены еще 2 полиморфизма, которые влияют на экспрессию ТС. При наличии в промоторе 3 тандемных повторов во 2-м повторе может возникнуть замена G>C, которая приводит к снижению стабильной связи промотора с транскрипционным фактором USF (up stimulating factor), снижая транскрипционную активность и повышая ответ на терапию. Другой полиморфизм в 3'-нетранслируемой области гена TYMS проявляется делецией 6 нуклеотидов (A-6). Наличие делеции приводит к снижению транскрипционной активности, изменяя стабильность белка [10].

Ассоциация полиморфизмов ТС с эффективностью лечения 5-ФУ больных РЖ, подтвержденная на клиническом материале, позволит использовать их в качестве дополнительных индивидуальных факторов прогноза и выявлять пациентов с низкой чувствительностью к 5-ФУ. Нами изучены полиморфизмы в 5'- и 3'- нетранслируемых областях гена TYMS у больных РЖ, а также проведено поиск взаимосвязи между полиморфизмами и клинико-морфологическими характеристиками РЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включили 80 больных с местнораспространенным РЖ, которые находились на лечении в Клинике факультетской хирургии им. Н.Н. Бурденко Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Средний возраст больных составил 64,2±10,0 года (от 41 года до 85 лет). Женщины составили 34%, мужчины – 45%. Всем 80 больным проведено хирургическое лечение: гастрэктомия – 47 (59%) пациентам, субтотальная дистальная резекция – 33 (41%). Лимфодиссекция в объеме D1 выполнена у 3 (4%) больных, D2 – у 70 (86%), D3 – у 7 (9%).

У всех пациентов РЖ подтвержден морфологическим исследованием операционного материала, в соответствии с классификацией Лорен интестинальный тип РЖ выявлен в 30 (45%) наблюдениях, диффузный – в 44 (55%).

У 69 (86%) пациентов при гистологическом исследовании интраоперационного материала обнаружены метастазы в регионарных лимфатических узлах (ЛУ) – N1, N2, N3.

Комбинированное лечение с последующим мониторингом в течение 3 лет после операции проводили 58 пациентам. На 1-м этапе выполнено хирургическое лечение, в послеоперационном периоде (2-й этап) проведена адъювантная химиотерапия по следующим схемам: 32 пациента получали только кселоду (капецитабин) – 1250 мг/м^2 2 раза в сутки с 1-го по 14-й день каждые 3 нед; 19 пациентам болюсно интраперитонеально на 10-е сутки после операции вводили кабоплатин – 150 мг (через установленный заранее интраоперационно катетер в брюшную полость) + кселоду – 1250 мг/м^2 2 раза в день с 1-го по 14-й дни каждые 3 нед; 5 пациентам – 5-ФУ 450 мг/м^2 в сутки внутривенно – 30-минутная инфузия с 1-го по 5-й дни + лейковорин 50 мг/м^2 в сутки внутривенно с 1-го по 5-й дни каждые 4 нед; 2 пациенткам – по схеме CapOX (XELOX): оксалиплатин – 130 мг/м^2 в 1 день, кселода (капецитабин) – по 1000 мг/м^2 2 раза в день с 1-го по 14-й дни каждые 3 нед.

Генотипирование пациентов по 3 полиморфизмам гена TYMS проводили на ДНК больных, выделенной из лимфоцитов периферической крови по стандартной методике методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом результатов в полиакриламидном геле (ПААГ). Специфические праймеры и условия ПЦР описаны ранее [10].

Основным критерием оценки эффективности лечения была общая выживаемость (ОВ), которую рассчитывали от начала лечения до даты последнего наблюдения или смерти (для выбывших из-под наблюдения – по дате их последнего визита. Выживаемость анализировали методом Каплана–Мейера и сравнивали по тесту log-rank).

Непараметрические данные в зависимости от количества наблюдений анализировали с использованием точного критерия Фишера.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistical Package for the Social Sciences software program (version 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведен анализ генетических полиморфизмов 5' (R2/R3 и G>C) и 3' (del 6) нетранслируемых областях гена TYMS, кодирующего тимидилатсинтетазу, у 80 пациентов с диагнозом РЖ. Результаты представлены в табл. 1. Показано, что у пациентов с генотипом 2R/2R на момент операции достоверно чаще встречалось метастатическое поражение регионарных ЛУ (p=0,047), выявленное при гистологическом исследовании операционного материала (N1, N2, N3). При сравнении групп пациентов с различным типом РЖ по классификации Лорен выявлено, что генотип -6/-6 достоверно чаще встречается при интестинальном типе РЖ, чем при диффузном (p=0,037), этот генотип также достоверно чаще встречался у пациентов с высоко- и умеренно дифференцированными аденокарциномами (p=0,015). Мы не нашли ассоциации исследуемых полиморфизмов гена TYMS с размером опухоли, возрастом манифестации заболевания, локализацией опухоли в желудке. При исследовании смешанных генотипов для промоторной области TYMS (R2/R3 и G>C) нам не удалось выявить достоверные ассоциации в группах с различными клиническими характеристиками.

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗОВ В 5'- И 3'-НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНА *TYMS* В РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ РЖ

Клиническая группа	N	3R/3R	2R/2R	2R/3R	C/C	C/G	G/G	A/A	A/A-6	A-6/A-6
Число пациентов	80	34	12	31	12	37	31	27	39	10
Высоко- /умеренно дифференцированная аденокарцинома (G1, G2)	35	13/34	3/34	18/34	5/35	18/35	12/35	12/35	14/35	9/35
Низкодифференцированная аденокарцинома (G3)	31	15/31	6/31	10/31	5/31	11/31	15/31	10/30	19/30	1/30
Перстневидноклеточный рак (G4)	14	6/12	3/12	3/12	2/14	8/14	4/14	5/11	6/11	0/11
P (KW)		0,590	0,317	0,103	0,975	0,292	0,351	0,758	0,265	0,0158*
Размер опухоли, см										
<2	12	6/12	0/12	6/12	3/12	7/12	2/12	3/12	7/12	2/12
2–4	29	13/27	4/27	10/27	5/29	14/29	10/29	9/26	13/26	4/26
>4	39	15/38	8/38	15/38	4/39	16/39	19/39	14/38	19/38	5/38
P (KW)		0,715	0,217	0,743	0,252	0,577	0,096	0,754	0,870	0,9438
Возраст манифестации, годы										
<50	11	5/11	2/11	4/11	2/11	5/11	4/11	6/11	5/11	0/11
50–60	15	5/12	1/12	6/12	1/15	5/15	9/15	4/15	8/25	3/25
>60	54	24/54	9/54	21/54	9/54	27/54	18/54	17/50	26/50	7/50
P (KW)		0,429	0,549	0,234	0,563	0,865	0,832	0,268	0,423	0,327
Кардия	9	2/9	2/9	5/9	1/9	2/9	6/9	3/9	5/9	1/9
Тело	44	22/43	8/43	13/43	10/44	19/44	15/44	17/42	22/42	3/42
Антральный отдел	27	10/25	2/25	13/25	1/27	16/27	10/27	7/25	12/25	6/25
P (KW)		0,252	0,076	0,131	0,101	0,094	0,314	0,275	0,559	0,561
Метастатическое поражение регионарных ЛУ (N1, N2, N3)	50	22/50	11/50	17/50	9/50	21/50	20/50	17/49	27/49	5/49
Отсутствие метастазов в регионарных ЛУ (N0)	30	12/27	1/27	14/27	3/28	16/28	11/28	10/27	12/27	5/27
P (F)		1,00	0,047*	0,1495	0,520	0,211	1,00	1,00	0,473	0,313
Интестинальный рак	35	14/34	3/34	17/34	5/35	18/35	12/35	12/35	15/35	8/35
Диффузный рак	45	20/43	9/43	14/43	7/45	19/45	19/45	15/41	24/41	2/41
P (F)		0,652	0,209	0,161	1,00	0,499	0,497	1,00	0,249	0,037*

Примечание: * – различия достоверны; N – число наблюдений (здесь и в табл. 2, 3).

Отдаленные результаты лечения 5-ФУ оценены у 58 больных, которым проводили комбинированное лечение – хирургическое с последующей адъювантной химиотерапией 5-ФУ. Медиана наблюдения пациентов составила 33 мес (от 4 до 40 мес). Из 58 (100%) пациентов 34 (55%) оставались в живых в течение всего периода наблюдения, 24 (45%) умерли от основного заболевания в первые 3 года после проведенного лечения. У 6 (10%) пациентов за период наблюдения возник рецидив заболевания, однако они были живы к окончанию периода наблюдения. Таким образом, возникновение рецидива РЖ (местный рецидив, канцероматоз брюшины, отдаленные метастазы) в течение первых 3 лет после комбинированного лечения отмечено у 30 (51%) больных.

Для определения связи отдаленных результатов лечения и генотипов 5'-нетранслируемого района гена TYMS (R2/R3 и G>C) у пациентов проведено исследование как отдельных, так и сочетанных генотипов. Результаты изучения полиморфизмов в различных клинических группах представлены в табл. 2, 3.

Выявлено, что генотип 3RG/3RG встречается достоверно чаще (p=0,024) в группе пациентов, у которых на фоне комбинированного лечения РЖ в течение 3 лет после операции возник рецидив заболевания (местный рецидив, канцероматоз брюшины, отдаленные метастазы). Генотип 2RG/3RC, напротив, с большей частотой выявлен в группе пациентов, у которых на фоне комбинированного лечения в течение 3 лет после операции не возникло рецидива заболевания (p=0,023).

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В 5'- И 3'-НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЯХ ГЕНА *TYMS* У ПАЦИЕНТОВ С РЖ ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

Клиническая группа	N	3R/3R	2R/3R	2R/2R	G/G	C/C	G/C	A/A	A/A-6	A-6/A-6
Число пациентов	58	20	16	12	26	11	21	18	30	6
С рецидивом, генерализацией в течение 3 лет	30	18/30	5/30	7/30	17/30	5/30	8/30	9/28	15/28	4/28
Без рецидива в течение 3 лет	28	12/29	11/28	5/28	9/28	6/28	13/28	9/26	15/26	2/26
P (F)		0,293	0,078	0,749	0,071	0,743	0,172	1,00	1,00	0,670

При изучении отдаленных результатов комбинированного лечения сравнивали общую (ОВ) и безрецидивную (БРВ) выживаемость в группах больных с определенными генотипами. При сравнении ОВ и БРВ в группах больных с комбинированными генотипами 5'-нетранслируемого района гена TYMS (2RG/3RC, 2RG/3RG, 3RC/3RG, 3RG/3RG, 3RC/3RC) и 3'-нетранслируемого района (A/A, A/A-6, A-6/A-6) достоверных различий не выявлено.

При исследовании генотипов 5'-нетранслируемого района отмечено, что показатели БРВ и ОВ достоверно ниже у больных с генотипом 3R/3R, чем с генотипом 2R/3R (соответственно p=0,049 и p=0,046; тест log-rank). Результаты исследования ОВ и БРВ представлены на рис. 2, 3.

Известно, что одним из механизмов действия 5-ФУ при осуществлении противоопухолевой активности является ингибирование фермента ТС. Функциональная активность последнего ТС модулируется влиянием полиморфных вариантов в ДНК гена TYMS, которые находятся в регуляторной области. Уровень активности ТС имеет особое значение в быстро делящихся опухолевых клетках, именно в них осуществляется основная функция фермента, связанная с поддержанием высокой скорости репликации ДНК. Цитотоксическое действие 5-ФУ связано с блокированием действия ТС, поэтому более высокая экспрессия ТС приводит к повышению резистентности к 5-ФУ. Показано, аллели с 3 повторами 3R в 5'-нетранслируемом районе характеризуются максимальной экспрессией ТС, что связано с худшим ответом на терапию 5-ФУ и соответственно худшей выживаемостью больных при колоректальном раке (КРР), раке пищевода и др. [11]. Наличие замены G>C во 2-м из 3 повторов приводит к снижению стабильной связи промотора с USF (up stimulating factor), снижая транскрипционную активность фермента и повышая у таких пациентов ответ на химиотерапию [12]. В настоящее время выделяют генотипы с высоким и низким уровнем экспрессии белка. К полиморфизмам с высоким уровнем экспрессии ТС относят 2R/3RG, 3RC/3RG, 3RG/3RG, а низкий уровень экспрессии ТС показан при генотипах 2R/2R, 2R/3RC, 3RC/3RC [4, 13]. Проведенные исследования позволяют рассматривать полиморфизмы в гене TYMS в качестве показателей индивидуальной чувствительности пациентов к терапии 5-ФУ.

Нами показано, что генотип 3RG/3RG достоверно чаще (p=0,024) встречается у пациентов с прогрессированием РЖ в течение первых 3 лет после операции, которым в послеоперационном периоде проводили химиотерапию. В то же время смешанный генотип 2RG/3RC достоверно чаще (p=0,023) выявляли в группе больных, у которых отсутствовал рецидив рака в течение первых 3 лет после операции. Наличие этого генотипа у больных ассоциировано со значительным снижением уровня экспрессии ТС, при наличии аллеля 3RC транскрипционная активность фермента сравнима с активностью при 2R, что приводит к повышению эффективности лечения 5-ФУ. Это подтверждают и наши результаты: достоверное снижение БРВ и ОВ (соответственно p=0,049 и p=0,046) отмечено у больных с генотипом 3R/3R (в отличие от генотипа 2R/3R).

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОЧЕТАННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ПРОМОТОРНОМ РАЙОНЕ ГЕНА *TYMS* У ПАЦИЕНТОВ С РЖ ПОСЛЕ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ

Клиническая группа	N	3G/3G	3G/3C	3C/3C	2G/3G	2G/3C	2G/2G
Число пациентов	58	6	13	11	8	8	12
С рецидивом, генерализацией в течение 3 лет	30	6	7	5	4	1	7
Без рецидива в течение 3 лет	28	0	6	6	4	7	5
P (F)		0,024	1,000	0,734	1,000	0,023	1,00

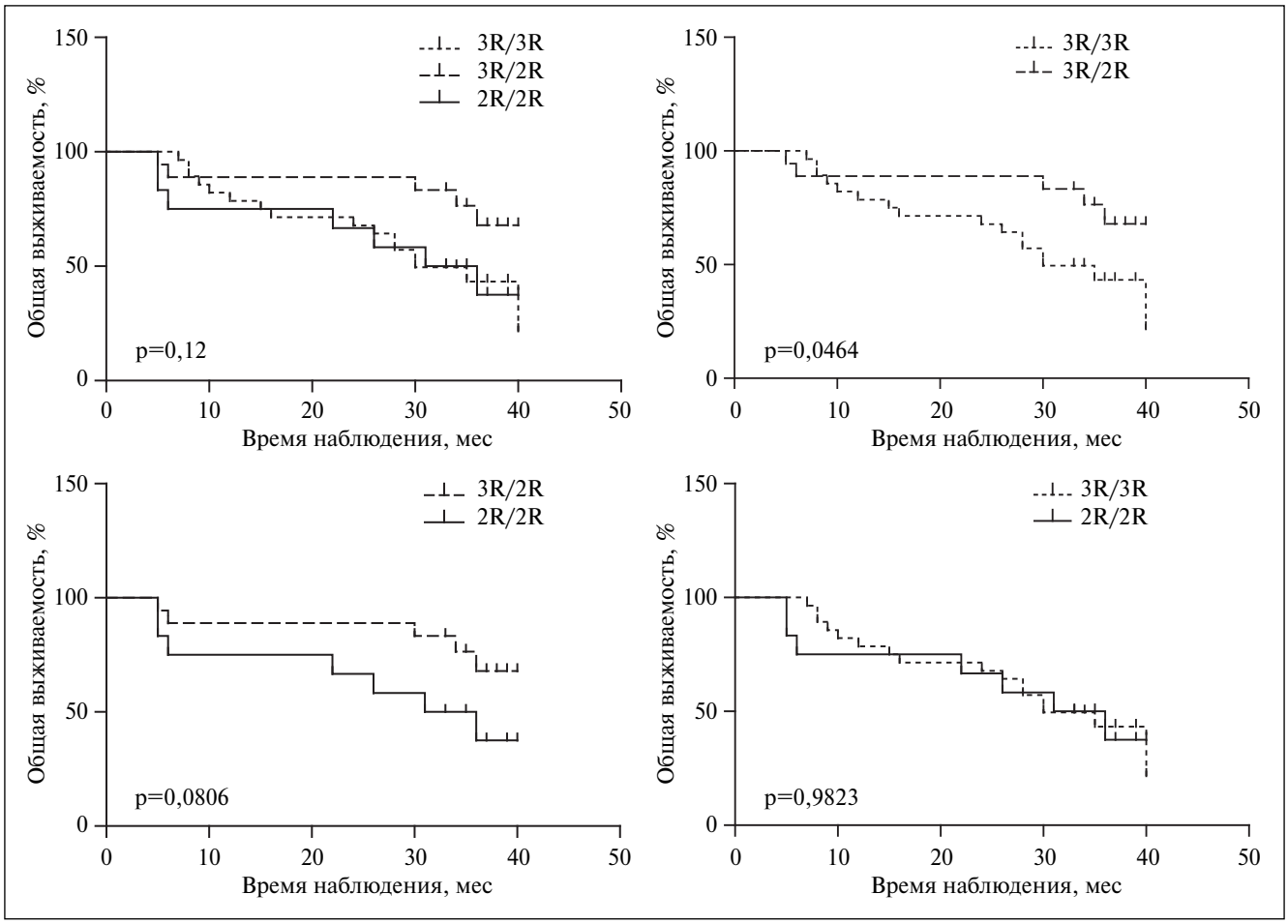

Рис. 2. *Полиморфизмы 3R/3R, 2R/2R, 3R/2R гена TYMS и ОВ больных РЖ (тест log-rank)*

Это согласуется с другими исследованиями, в которых генотипы 3RG/3RG и 3R/3R относятся к неблагоприятным генотипам с высоким уровнем экспрессии ТС и связаны с худшим ответом на адъювантную химиотерапию и, соответственно, худшим прогнозом, в то время как генотипы 2RG/3RC и 2R/3R – с низкой экспрессией и лучшим прогнозом. В некоторых работах отмечено, что экспрессия ТС, выявленная при иммуногистохимическом исследовании, может выступать в роли прогностического фактора развития рецидива и плохой выживаемости у больных РЖ, получавших адъювантную химиотерапию с применением 5-ФУ [5]. Однако в ряде исследований [4, 11] не выявлено достоверной связи между экспрессией ТС, полиморфизмами гена TYMS и ответом на химиотерапию 5-ФУ.

Результаты исследований генотипов ТС в разных выборках больных и при разных типах рака неоднозначны. Существуют работы, в которых установлено улучшение ОВ у пациентов с КРР при генотипе 3R/3R [11, 14].

Помимо взаимосвязи полиморфизмов в гене TYMS с эффективностью адъювантной химиотерапии при комбинированном лечении больных местнораспространенным РЖ, мы также изучали их ассоциацию с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. У пациентов с генотипом 2R/2R достоверно чаще встречается метастатическое поражение регионарных ЛУ, выявленных при гистологическом исследовании операционного материала (p=0,047), что является неблагоприятным фактором прогноза для больных РЖ. Возможно, это связано с тем, что низкий уровень ТС при полиморфизме 2R/2R приводит к нарушению синтеза ДНК в опухолевой клетке, повышает частоту мутационного процесса и способствует возникновению мутаций, приводящих к более агрессивному опухолевому фенотипу, связанному с метастазированием в регионарные ЛУ. Существуют работы, в которых изучались ассоциации полиморфизмов TYMS и экспрессии ТС с клинико-морфологическими характеристиками опухоли при КРР, но достоверных данных получено не было [15]. Исходя из наших результатов, генотип 2R/2R можно расценивать как фактор, связанный с неблагоприятным прогнозом при РЖ, а именно метастазированием в регионарные ЛУ.

В настоящей работе при исследовании полиморфизмов в 3'-нетранслируемой области у пациентов

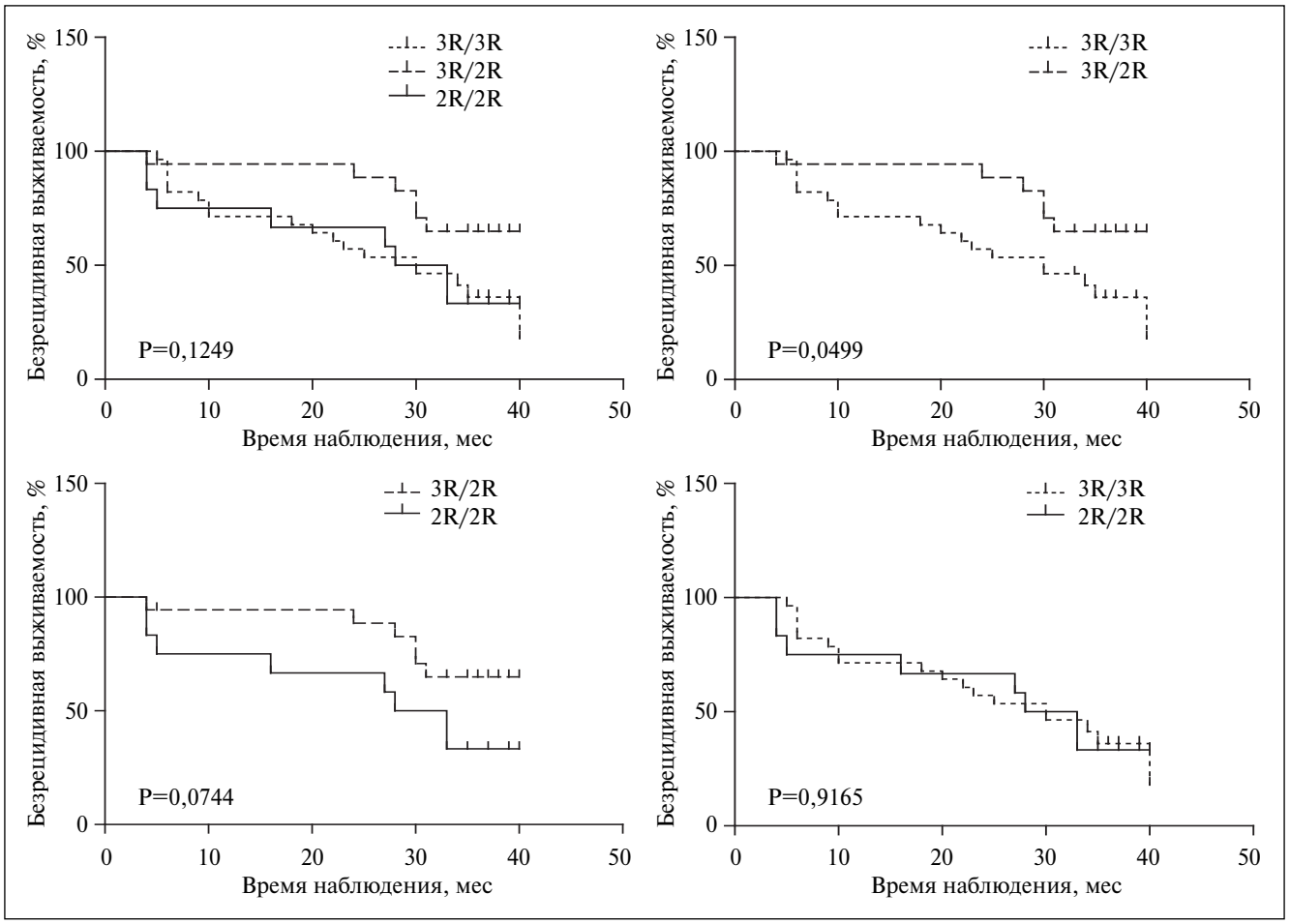

Рис. 3. *Полиморфизмы 3R/3R, 2R/2R, 3R/2R гена TYMS и БРВ больных РЖ (тест log-rank)*

с гомозиготным состоянием -6/-6 достоверно чаще встречались опухоли интестинального типа по Лорен, а также высоко- и умеренно дифференцированные аденокарциномы (соответственно p=0,037 и p=0,033), что связано с более благоприятным прогнозом для больных РЖ. Как отмечалось ранее, делеция 6bp на 3'UTR ТС приводит к дестабилизации РНК in vitro и связана с низкой экспрессией ТС in vivo. Наличие делеции в 3'-нетранслируемой области снижает экспрессию ТС у пациентов с генотипом -6/-6 в 3 раза по сравнению с таковой у пациентов без делеции (+6/+6). Можно предположить, что цитотоксическое действие при низкой активности ТС влияет на репликацию ДНК, приводя к накоплению мутаций и структурных нарушений в процессе репликации. Нами показано, что повышение аллельного дисбаланса характерно для интестинального типа рака, тогда как для диффузного типа более характерны эпигенетические нарушения, которые могут проявляться аномальным метилированием генов-супрессоров опухолевого роста [16]. Вероятно, низкая активность ТС, модулируемая полиморфизмом в 3'-нетранслируемой области гена TYMS при генотипе -6/-6 каким-либо образом проявляется в генезе интестинального рака.

В исследовании [6] изучалась взаимосвязь экспрессии ТС с клинико-морфологическими характеристиками РЖ. Было показано, что в высокодифференцированных аденокарциномах экспрессия ТС ниже, что также подтверждает наши результаты. В то же время в других работах не отмечено взаимосвязи между полиморфизмами 3'UTR и активностью ТС [2]. При изучении БРВ и ОВ больных РЖ с делецией 6 нуклеотидов в 3`UTR нами не отмечено достоверной разницы, что, возможно, связано с небольшим числом наблюдений в группах. Однако были исследования, в которых установлено достоверное увеличение ОВ больных КРР с адъювантной химиотерапией 5-ФУ после хирургического лечения при наличии смешанного генотипа 3R/2R+ A-6/A-6 по сравнению с генотипом 3R/2R и наличием хотя бы 1 аллеля без делеции [15, 8].

На основании полученных данных можно предположить, что полиморфизмы в 5'- и 3'-некодирующих районах гена TYMS могут влиять на клиническое течение рака желудка, а также на эффективность химиотерапии 5-ФУ, а потому эти факторы можно использовать в качестве дополнительных молекулярно-генетических маркеров в оценке прогноза и эффективности адъювантного лечения больных РЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Черноусов А.Ф., Хоробрых Т.В., Быков И.И., Немцова М.В., Глухов А.И., Свинарева Л.В. Первый опыт использования маркеров молекулярно-генетической нестабильности слизистой в диагностике рака желудка. Вестник хирургической гастроэнтерологии. 2011; 4: 13–21.
(Chernousov A.F., Khorobrich T.V., Bykov I.I., Nentsova M.V., Gluhov A.I., Svinareva L.V. First experience of using molecular markers of genetic instability in the diagnosis of gastric cancer. Vestnic Khirurgicheskoy Gastroenterologii. 2011; 4: 13–21 (in Russian))
2. Mari E., Floriani I.,Tinazzi A. Efficacy of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis of published randomised trials. A study of the GISCAD (Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell'Apparato Digerente). Ann. Oncol. 2000; 11: 837–43.
3. Jackman A.L., Calvert A.H. Folate-based thymidylate synthase inhibitors as anticancer drugs. Ann. Oncol. 1995; 6: 9: 871–81.
4. Gosens M.J., Moerland E., Lemmens V.P., Rutten H.T., Tan-Go I., van den Brule A.J. Thymidylate synthase genotyping is more predictive for therapy response than immunohistochemistry in patients with colon cancer. Int. J. Cancer. 2008; 123: 8: 1941–9.
5. Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. Nature Reviews. 2003; 3: 5: 330–8.
6. Choi J., Lim H., Nam D.K., Kim H.S., Cho D.Y., Yi J.W., Kim H.C., Cho Y.K., Kim M.W., Joo H.J., Lee K.B., Kim K.B. Expression of thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. Br. J. Cancer. 2001; 84 (2): 186–92.
7. Gusella M., Frigo A.C., Bolzonella C., Marinelli R., Barile C., Bononi A., Crepaldi G., Menon D., Stievano L., Toso S., Pasini F., Ferrazzi E., Padrini R. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. Br. J. Cancer. 2009; 100: 1549–57.
8. Soong R., Boedefeld W.M., Heslin M.J., Wang K. Correlation between thymidylate synthase (TS) enhancer region sequence variants and RNA and protein levels in colorectal normal mucosa and tumors. Proc Am Soc Clin Oncol. 2003; 22: 123.
9. Kuramoci H., Tnaka K., Oh D., Lehman B.J., Dust C.M., Yang D.Y., De Meester S.R., Hagen J.A., Danenberg K.D., De Meester T.R., Danenberg P.V. Thymidylate synthase polymorphisms and mRNA expression are independent chemotherapy predictive markers in esophageal adenocarcinoma patients. Int. J. Oncology. 2008; 32: 201–8.
10. Fariña-Sarasqueta A., Gosens M.J., Moerland E., van Lijnschoten I., Lemmens V.E., Slooter G.D., Rutten H.J., van den Brule A.J. TS gene polymorphisms are not good markers of response to 5-FU therapy in stage III colon cancer patients. Anal. Cell Pathol. (Amst). 2010; 33: 1: 1–11.
11. Deenen M.J., Cats A., Beijnen J.H., Schellens J.H.M. Part 4: Pharmacogenetic Variability in Anticancer Pharmacodynamic Drug Effect. The Oncologist. 2011; 16: 1006–20.
12. Calascibetta D., Cabibi A., Martorana G., Sanguedolce G., Rausa L., Feo S., Dardanon G., Sanguedolce R. Thymidylate Synthase Gene Promoter Polymorphisms are Associated with TSmRNA Expressions but not with Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Anticancer Res. 2004; 24: 3875–80.
13. Goekkurt E., Hoehn S., Wolschke C., Wittmer C., Stueber C., Hossfeld D.K., Stoehlmacher J. Polymorphisms of glutathione S-transferases (GST) and thymidylate synthase (TS)--novel predictors for response and survival in gastric cancer patients. Br. J. Cancer. 2006; 30: 94 (2): 281–6.
14. Jakobsen A., Nielsen J.N., Gyldenkerne N., Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 1365–9.
15. Hitre E., Budai B., Adleff V., Vilmos A., Czegle F., Zsolt H., Fruzsina G., Lovey J., Tibor K., Orosz Z., Lang I., Kasler M., Kralovanszky J. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. Pharmacogenetics and Genomics; 2005: 15: 723–30.
16. Немцова М.В., Быков И.И., Удилова А.А., Залетаев Д.В., Хоробрых Т.В. Аллельный дисбаланс локусов 17p13.1 (TP53), 1p36.1(RUNX3), 16p22(CDH1) и микросателлитная нестабильность при раке желудка. Молекулярная биология. 2013; 47 (5): 835–41.
(Nemtsova M.V., Bykov I.I., Udilova A.A., Zaletaev D.V., Kchorobrich T.V. Allelic imbalance of loci 17p13.1 (TP53), 1p36.1 (RUNX3), 16p22 (CDH1) and microsatellite instability in gastric cancer. Molecular biology. 2013; 47 (5): 835–41 (in Russian))

Поступила 18 июня 2014 г.

Новости науки

ИРИЗИН МОЖЕТ ОПРЕДЕЛЯТЬ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

В 2012 г. группой ученых был открыт ранее неизвестный гормон, названный иризином. Иризин образуется в скелетных мышцах при физической нагрузке. Тогда же было установлено, что он действует на клетки белой жировой ткани, в которых у млекопитающих запасается жир. Воздействие гормона превращает их в клетки бурой жировой ткани, отвечающие за производство тепла. При введении в кровь иризин повышал расход энергии у мышей даже без изменения их подвижности и диеты. Это вызывало снижение массы тела и содержания сахара в крови у мышей, страдающих ожирением.

В феврале 2014 г. в журнале Age опубликовано сообщение ученых из Астонского университета (Великобритания) под руководством J. Brown, которые выяснили, что существует связь уровня иризина в крови с биологическим маркером старения – длиной теломер. Теломеры – небольшие участки на концах хромосом; они укорачиваются по мере продвижения организма как совокупности клеток к биологической гибели. Маленькая длина теломер связана со многими заболеваниями, обычно ассоциированными во старческим возрастом (такими, как заболевания сердца, рак, болезнь Альцгеймера). Изучая группу здоровых людей, не страдающих ожирением, исследователи установили, что при более высоком уровне иризина длина теломер больше. Поскольку физические упражнения приводят к образованию иризина, ученые полагают, они нашли объяснение общеизвестному факту, согласно которому активный образ жизни снижает биологический возраст организма и уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний.

Cell Metabolism, Volume 19, Issue 2, 302–309, 4 February. – 2014.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 618.11-006.04-078.33

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА (ИФР) И ИФР-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ С НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯИЧНИКОВ

Е.С. Герштейн[1], доктор биологических наук, профессор, **Э.Р. Исаева**[1], **Д.Н. Кушлинский**[2], **Е.А Короткова**[1], кандидат биологических наук, **В.Д. Ермилова**[1], кандидат медицинских наук, **К.П. Лактионов**[1], доктор медицинских наук, профессор, **Л.В. Адамян**[2], академик РАН, профессор

[1]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24;

[2]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России, Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

E-mail: esgershtein@gmail.com

Введение. *Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста (ИФР) играет важнейшую роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей, в том числе рака яичников, поэтому ее компоненты рассматриваются в качестве потенциальных диагностических и прогностических маркеров заболевания и мишеней для молекулярно-направленной терапии.*

Цель исследования. *Сравнительная оценка содержания ИФР-I и II и ИФР-связывающих белков (ИФРСБ)-1, 2 и 3 в сыворотке крови и опухолях больных с новообразованиями яичников, а также анализ взаимосвязи с клинико-морфологическими особенностями рака яичников.*

Методы. *Содержание ИФР-I, II и ИФРСБ-1, 2, 3 определено в сыворотке крови и экстрактах опухолей у 44 больных раком, 11 больных с пограничными и 12 – с доброкачественными опухолями яичников с помощью наборов для прямого иммуноферментного анализа Mediagnost. В контрольную группу вошли 33 практически здоровые женщины.*

Результаты. *Уровень ИФР-I достоверно понижен, а ИФРСБ-1 – повышен в сыворотке крови больных раком яичников по сравнению со всеми остальными группами. Уровень ИФРСБ-2 повышен в крови больных раком и с пограничными опухолями по сравнению с показателем в контроле и у больных с доброкачественными опухолями. Значимых отличий в содержании исследованных маркеров в доброкачественных, пограничных и злокачественных опухолях не выявлено, за исключением повышения уровня ИФР СБ-2 в ткани рака яичников. Взаимосвязи большинства исследованных показателей с клинико-морфологическими особенностями рака яичников не обнаружено.*

Заключение. *Выявлены нарушения баланса ИФР/ИФРСБ у больных раком яичников. Показано, что ИФРСБ-2 – потенциальный серологический маркер рака яичников; чувствительность определения – 90% при 90% специфичности.*

Ключевые слова: *ИФР-I, ИФР-II, ИФРСБ-1, ИФРСБ-2, ИФРСБ-3, опухоли яичников*

INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS (IGF) AND IGF BINDING PROTEINS IN BLOOD SERUM AND TUMORS OF OVARIAN TUMOR PATIENTS

E.S. Gershtein[1], E.R. Isaeva[1], D.N. Kushlinsky[2], E.A. Korotkova[1], V.D. Ermilova[1], K.P. Laktionov[1], L.V. Adamyan[2]

[1]N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478;

[2]Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Akademika Oparina, 4, Moscow, Russian Federation, 117997

Introduction. *Insulin-like growth factor signaling system plays a major role in the development and progression of various malignant tumors including ovarian cancer, and its components are considered as potential diagnostic and prognostic markers and objects of the molecular targeted therapy.*

The aim of the study. *Comparative evaluation of insulin-like growth factors (IGF) I and II, and IGF-binding proteins (IGFBP)-1, 2 and 3 content in blood serum and tumors of ovarian tumor patients and analysis of their associations with key clinical and pathological characteristics of ovarian cancer.*

Methods. *IGF-I, II, IGFBP-1, 2 and 3 levels were measured with standard ELISA kits (Mediagnost) in blood serum and tumor extracts of 44 ovarian cancer, 12 benign and 11 borderline ovarian tumor patients. Control group comprised 33 practically healthy women.*

Results. *Serum IGF-1 content in ovarian cancer patients was significantly lower, and IGFBP-1 content was higher than in all other groups. IGFBP-2 level was increased both in ovarian cancer and borderline tumor groups as compared to control and benign ovarian tumor patients. No significant differences were found between IGF/IGFBPs content in benign, borderline and malignant ovarian tumors. No significant associations were found between the majority of parameters studied and main clinical and pathological characteristics of ovarian cancer.*

Conclusion. *Disturbances in IGFs/IGBPs balance were revealed in blood serum of ovarian cancer patients. IGFBP-2 proved to be a potential diagnostic serological marker with 90% specificity and 90% sensitivity.*

Key words: *IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, ovarian tumors*

Рак яичников – одна из наиболее инвазивных и злокачественных опухолей женской репродуктивной системы; у большинства пациенток заболевание диагностируется в поздних стадиях, когда опухоль уже распространена по брюшине. Трудности ранней диагностики и высокий метастатический и инвазивный потенциал рака яичников определяют необходимость углубленного изучения механизмов роста и распространения этой опухоли; их знание могло бы стать основой для прогнозирования результатов стандартного лечения больных и включения в схемы препаратов, целенаправленно воздействующих на регуляторные молекулы.

Важнейшую роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей играет сигнальная система инсулиноподобных факторов роста (ИФР). Она включает ИФР 2 типов: ИФР-I и ИФР-II – митогенные пептиды, высокогомологичные друг другу и инсулину, синтезирующиеся в печени и некоторых других тканях под влиянием соматотропного гормона гипофиза, воздействующие на периферические ткани и распространяющиеся по организму с кровью (центральный или эндокринный механизм действия), а также их трансмембранные клеточные рецепторы и ИФР-связывающие белки (ИФРСБ) крови. ИФР синтезируются также клетками различных опухолей и являются в этом случае ауто/паракринными медиаторами, опосредующими рост, метастазирование и антиапоптотический ответ злокачественных клеток. ИФР, рецепторы ИФР и ИФРСБ образуют сложную сеть взаимодействий между собой и с другими биологическими регуляторами роста и выживаемости клеток.

Известно 6 ИФРСБ, связывающих ИФР с одинаковым или даже бóльшим сродством, чем ИФР-рецепторы, а также семейство гомологичных ИФРСБ, которые обладают значительно меньшим сродством к ИФР-лигандам. ИФРСБ модулируют биологическую доступность и активность ИФР несколькими способами: осуществляют перенос ИФР из периферической крови к тканям-мишеням (ИФРСБ-1, 2 и 4), поддерживают резервный уровень ИФР в крови (главным образом ИФРСБ-3), усиливают или ингибируют эффекты ИФР, а также опосредуют некоторые ИФР-независимые биологические эффекты. В различных физиологических условиях ИФРСБ могут как стимулировать, так и подавлять эффекты ИФР, продлевая время полужизни факторов роста либо конкурируя с рецепторами за их связывание. Активность самих ИФРСБ и (опосредованно) клеточные эффекты ИФР регулируются специфическими протеазами, в частности сериновыми протеазами и матриксными металлопротеазами, которые увеличивают биодоступность ИФР, гидролизуя ИФРСБ до небольших фрагментов, обладающих меньшим сродством к ИФР.

Сигнальная система ИФР играет важную роль при нормальном функционировании яичников [1], а также возникновении и прогрессировании злокачественных эпителиальных опухолей [2]. Все компоненты этой системы экспрессируются в клетках рака яичников и являются значимыми факторами прогноза заболевания [3–5]. В то же время роль циркулирующих в периферической крови ИФР и ИФРСБ в возникновении и прогрессии рака яичников неоднозначна. Одной из важнейших причин для исследования роли ИФР-сигнальной системы при раке яичников является возможность использования специфических (таргетных) ингибиторов для подавления ее активности [6–8]. Существует несколько подходов к решению этого вопроса: снижение уровня и(или) биологической активности циркулирующих факторов роста, блокирование функции рецепторов и активация AMP-киназы, блокирующей нижележащие эффекты рецепторов ИФР. В экспериментальных исследованиях продемонстрирована возможность торможения роста рака яичников с помощью моноклональных антител к ИФР-рецепторам [9, 10] и низкомолекулярных ингибиторов их активности [11, 12], а также активатора AMP-киназы метформина [6, 13]. Проводятся также первые клинические испытания подобных препаратов при раке яичников [14, 15].

Цель данного исследования – сравнительная оценка содержания ИФР-I, II и ИФРСБ-1, 2 и 3 типов в сыворотке крови и опухолях больных с различными новообразованиями яичников, а также анализ взаимосвязи изученных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями рака яичников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включили 44 больных раком, а также 11 больных с пограничными и 12 – с доброкачественными новообразованиями яичников; контрольную группу составили 33 практически здоровые женщины. Все группы были сравнимы по возрасту обследованных; медиана составила соответственно 56,5 (21–82); 35 (22–55); 48 (20–71) и 37 (24–65) лет. По гистологическому строению 3 доброкачественные опухоли принадлежали к серозному типу, 4 – к эндометриоидному, 5 относились к другим гистологическим типам. Пограничные опухоли были преимущественно серозного (у 6 пациенток) или муцинозного (у 3) типов; 72% злокачественных опухолей представляли собой серозные аденокарциномы. У 8 больных раком яичников установлена I стадия заболевания по классификации FIGO, у 4 – II стадия, у остальных был распространенный процесс с преобладанием IIIc стадии (18 больных).

Содержание ИФР-I, II и ИФРСБ-1, 2, 3 исследовали в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, и в лизатах опухолей, обработанных, как описано ранее [16]. Концентрацию маркеров определяли с помощью стандартных наборов для прямого иммунофер-

ментного анализа производства компании Mediagnost (Германия) в соответствии с инструкциями производителей. Измерения проводили на автоматическом анализаторе BEP-2000 (Siemens Healthcare, Германия). Концентрацию исследованных показателей в сыворотке крови выражали в нанограммах (нг) на 1 мл, в тканях – в нг/мг общего белка, определенного по методу Лоури.

Данные обрабатывали с помощью программы Statistica 7.0. В связи с тем, что распределение большинства исследованных показателей отличалось от нормального, при их сравнении и анализе взаимосвязей использовали непараметрические методы: критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса, тест корреляции рангов Спирмена (R). Различия и корреляции считали достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе статистического анализа мы сопоставили содержание ИФР и ИФР СБ в сыворотке крови больных с доброкачественными, пограничными и злокачественными опухолями яичников и обследованных контрольной группы (табл. 1). Обнаружены достоверное снижение медианного уровня ИФР-I и увеличение содержания ИФРСБ-1 в сыворотке крови больных раком яичников по сравнению с показателями у пациенток в остальных группах, тогда как уровень ИФР-II был практически одинаковым. Содержание ИФРСБ-2 было повышено в сыворотке крови больных раком и пограничными опухолями яичников (по сравнению как с контролем, так и с больными доброкачественными новообразованиями). Наиболее высокий уровень ИФРСБ-3 выявлен в сыворотке крови женщин контрольной группы, самый низкий – у больных раком яичников (без достоверных различий); в целом тенденция не достигала уровня статистической значимости (p=0,059). Аналогичные изменения уровня ИФР-I наблюдались у больных с другими опухолями репродуктивной системы – раком молочной железы [17] и раком шейки матки [18]. Выявленные закономерности соответствуют также данным литературы о содержании ИФР-I и ИФРСБ в сыворотке крови больных раком яичников [19–21], но, как и эти данные, они находятся в определенном противоречии с результатами некоторых эпидемиологических исследований, свидетельствующих о связи высоких сывороточных уровней ИФР-I с риском развития рака яичников в определенных возрастных группах [22]. Следует, однако, отметить, что совместный анализ данных 3 когортных исследований [23] не подтвердил влияния компонентов системы ИФР на риск развития рака яичников.

Выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнем ИФР-I в сыворотке крови всех больных новообразованиями яичников и уровнем ИФРСБ-1 (R=-0,45; p=0,0004) и ИФРСБ-2 (R=-0,43; p=0,008), а также положительная – между ИФР-I и ИФРСБ-3 (R=0,57; p=0,00004). Уровни ИФРСБ-1 и ИФРСБ-2 также положительно коррелировали между собой (R=0,65; p=0,00002). Аналогичные взаимосвязи обнаружены и у больных раком яичников. В то же время в сыворотке крови женщин контрольной группы не выявлено взаимосвязи уровня ИФР-I ни с одним из изученных ИФРСБ, тогда как уровень ИФР-II положительно коррелировал с ИФРСБ-3. Совокупность этих данных свидетельствует о нарушении баланса между ИФР и связывающими их белками крови у больных раком и с другими новообразованиями яичников и косвенно отражает различную роль ИФРСБ-1 и -2, с одной стороны, и ИФРСБ-3 – с другой, в регуляции биодоступности ИФР.

Потенциально значимыми серологическими маркерами рака яичников оказались только ИФРСБ-1 и ИФРСБ-2, уровень которых повышен у больных раком (оба маркера) и пограничными опухолями (ИФРСБ-2). Для оценки диагностической значимости мы рассчитали их чувствительность при различных уровнях специфичности (табл. 2). Оказалось,

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-I, -II И ИФРСБ-1, 2, 3 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ, ПОГРАНИЧНЫМИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ

Опухоли яичников	Число больных	ИФР-I	ИФР-II	ИФРСБ-1	ИФРСБ-2	ИФРСБ-3
Контрольная группа (0)	33	120 (104–160)	855 (618–1158)	4,21 (2,09–10,5)	144 (123–224)	4788 (4160–5550)
Доброкачественные (1)	12	130 (82,9–184)	772 (687–874)	2,49 (0,54–5,52)	202 (170–222)	1367 (1185–1855)
Пограничные (2)	11	124 (82,7–162)	883 (633–1171)	5,52 (0,52–11,0)	929 (268–1121)	1567 (1110–2341)
Злокачественные (3)	44	86,3 (56,5–120)	770 (638–1199)	16,7 (6,8–36,9)	913 (564–1861)	1027 (0–1935)

Примечание: здесь и в табл. 3: данные представлены в виде медианы и квартилей (25–75%; в скобках, нг/мл). ИФР-I: p_{0-3}=0,0016; p_{1-3}=0,021; p_{2-3}=0,03. ИФРСБ-1: p_{0-3}=0,04; p_{1-3}=0,0003; p_{1-2}=0,0005; p_{2-3}=0,011. ИФРСБ-2: p_{0-2}=0,0009; p_{0-3}=0,00001; p_{1-2}=0,012; p_{1-3}=0,001.

что чувствительность ИФРСБ-1 при приемлемом уровне специфичности (≥70%) составляет не более 61%, тогда как ИФРСБ-2 обладает достаточно высокой чувствительностью (76–95%) при специфичности 95–70%. Оптимальным пороговым уровнем этого маркера является, на наш взгляд, показатель 320 нг/мл, при котором и чувствительность, и специфичность составляют 90%.

Дополнительным свидетельством в пользу возможности использования ИФРСБ-2 в качестве серологического маркера рака яичников является положительная взаимосвязь его содержания в сыворотке крови со стадией рака яичников (R=0,52; p=0,008) и положительная корреляция уровня данного маркера с показателями классического маркера рака яичников CA-125 (R=0,39; p=0,041). Уровни остальных изученных компонентов системы ИФР не были связаны ни со стадией по классификации FIGO, ни с уровнем CA-125. Кроме того, детальный анализ взаимосвязей уровня исследованных белков с основными показателями распространенности рака яичников (размер первичной опухоли по данным УЗИ, наличие и характер диссеминации по брюшине и метастазов в большом сальнике, наличие и объем асцита) также не выявил каких-либо достоверных корреляций. Не обнаружено зависимости сывороточных уровней ИФР/ИФРСБ от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли.

Важно было выяснить, в какой мере уровень ИФР и ИФРСБ в периферической крови отражает содержание соответствующих белков в опухолевой ткани. Оказалось, что достоверная, но достаточно слабая корреляция сывороточных и тканевых показателей наблюдается только для ИФР-I (R=0,34; p=0,029). Выраженные различия тканевого содержания при доброкачественных, пограничных и злокачественных опухолях яичников выявлены только для ИФРСБ-2, уровень которого был достоверно повышен в опухолевой ткани при раке яичников (табл. 3). Установлено также снижение концентрации ИФР-I в ткани рака яичников по сравнению с показателем при доброкачественных и пограничных опухолях, но эти различия не достигали уровня статистической значимости. Тканевые концентрации исследованных белков не зависели от основных клинико-морфологических характеристик рака яичников.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное иммуноферментное исследование содержания ИФР-I и II и связывающих их белков 1–3 типов в сыворотке крови и опухолях больных с различными новообразованиями яичников продемонстрировало существенные нарушения баланса ИФР/ИФРСБ у больных раком яичников, свидетельствующие об увеличении биодоступности ИФР для опухолевых клеток при отсутствии выраженных изменений концентрации самих факторов роста (ИФР-II) или даже при ее снижении (ИФР-I). Показано, что ИФРСБ-2 является потенциальным серологическим маркером рака яичников, концентрация которого зависит от стадии заболевания и коррелирует с показателями CA-125, а чувствитель-

Таблица 2

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ИФРСБ-1 И -2 КАК СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА ЯИЧНИКОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Маркер	Специфичность, %	Пороговое значение, нг/мл	Чувствительность, %
ИФРСБ-1	95	14,9	51
	90	12,5	54
	80	12,0	56
	70	9,0	61
ИФРСБ-2	95	535	76
	90	320	90
	80	248	95
	70	206	95

Таблица 3

СОДЕРЖАНИЕ ИФР-I, -II И ИФРСБ-1, 2, 3 В ТКАНИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ, ПОГРАНИЧНЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ

Опухоли яичников	Число больных	ИФР-I	ИФР-II	ИФРСБ-1	ИФРСБ-2	ИФРСБ-3
Доброкачественные (1)	12	1,37 (0,79–2,23)	0,42 (0,09–0,60)	0,09 (0,01–0,18)	6,41 (5,38–7,56)	6,50 (4,46–6,98)
Пограничные (2)	11	1,57 (1,11–2,34)	0,42 (0,18–0,64)	0,11 (0,03–0,17)	24,3 (8,83–38,7)	6,18 (5,23–11,95)
Злокачественные (3)	44	1,02 (0–1,94)	0,42 (0,23–0,83)	0,10 (0,05–0,33)	118 (60–165)	8,63 (5,29–11,60)

Примечание: ИФРСБ-2: p_{1-3}=0,008; p_{2-3}=0,011.

ность при 90% специфичности также составляет 90%. Несмотря на то, что взаимосвязи большинства исследованных показателей с основными клинико-морфологическими особенностями рака яичников не обнаружено, они могут оказаться независимыми факторами прогноза заболевания при дальнейшем наблюдении пациентов.

* * *

Исследование поддержано РФФИ, грант 12-03-00401.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Druckmann R., Rohr U.D. IGF-1 in gynaecology and obstetrics: update 2002. Maturitas. 2002; 41 (Suppl. 1): 65–83.
2. Brokaw J., Katsaros D., Wiley A. et al. IGF-I in epithelial ovarian cancer and its role in disease progression. Growth Factors. 2007; 25 (5): 346–54.
3. Huang G.S., Brouwer-Visser J., Ramirez M.J. et al. Insulin-like growth factor 2 expression modulates Taxol resistance and is a candidate biomarker for reduced disease-free survival in ovarian cancer. Clin. Cancer Res. 2010; 16 (11): 2999–3010.
4. Sayer R.A., Lancaster J.M., Pittman J. et al. High insulin-like growth factor-2 (IGF-2) gene expression is an independent predictor of poor survival for patients with advanced stage serous epithelial ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 2005; 96 (2): 355–61.
5. Spentzos D., Cannistra S.A., Grall F. et al. IGF axis gene expression patterns are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. Endocr. Relat. Cancer. 2007; 14 (3): 781–90.
6. Beauchamp M.C., Yasmeen A., Knafo A., Gotlieb W.H. Targeting insulin and insulin-like growth factor pathways in epithelial ovarian cancer. J. Oncol. 2010; 2010: 257058.
7. Bruchim I., Werner H. Targeting IGF-1 signaling pathways in gynecologic malignancies. Expert. Opin. Ther. Targets. 2013; 17 (3): 307–20.
8. Westin S.N., Herzog T.J., Coleman R.L. Investigational agents in development for the treatment of ovarian cancer. Invest. New Drugs. 2012; 31 (1): 213–29.
9. Maloney E.K., McLaughlin J.L., Dagdigian N.E. et al. An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation. Cancer Res. 2003; 63 (16): 5073–83.
10. Shao M., Hollar S., Chambliss D. et al. Targeting the insulin growth factor and the vascular endothelial growth factor pathways in ovarian cancer. Mol. Cancer Ther. 2012; 11 (7): 1576–86.
11. Ji Q.S., Mulvihill M.J., Rosenfeld-Franklin M. et al. A novel, potent, and selective insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor blocks insulin-like growth factor-I receptor signaling in vitro and inhibits insulin-like growth factor-I receptor dependent tumor growth in vivo. Mol. Cancer Ther. 2007; 6 (8): 2158–67.
12. Karp D.D., Pollak M.N., Cohen R.B. et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the insulin-like growth factor type 1 receptor inhibitor figitumumab (CP-751,871) in combination with paclitaxel and carboplatin. J. Thorac. Oncol. 2009; 4 (11): 1397–1403.
13. Beauchamp M.C., Knafo A., Yasmeen A. et al. BMS-536924 sensitizes human epithelial ovarian cancer cells to the PARP inhibitor, 3-aminobenzamide. Gynecol. Oncol. 2009; 115 (2): 193–8.
14. Banerjee S., Kaye S.B. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. Clin. Cancer Res. 2013; 19 (5): 961–8.
15. Tolcher A.W., Mita M., Meropol N.J. et al. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J. Clin. Oncol. 2007. 25 (11): 1390–5.
16. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Щербаков А.М. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 7 и 9 и их тканевые ингибиторы 1 и 4 типа в опухолях и плазме крови больных раком толстой кишки. Бюл. эксперимент. биол. мед. 2007; 143 (3): 438–41. (Gershtein E.S., Korotkova E.A., Scherbakov A.M. et al. Matrix metalloproteinases 7 and 9 and their type 1 and 4 tissue inhibitors in tumors and blood plasma of colorectal cancer patients. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2007; 143 (3): 438–41 (in Russian))
17. Масляев А.В., Костылева О.И., Герштейн Е.С. и соавт. Инсулиноподобные факторы роста в сыворотке крови больных раком молочной железы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012; 10: 16–20. (Maslayev A.V., Kostyleva O.I., Gershtein E.S. et al. Insulin-like growth factors in blood serum of breast cancer patients. Voprosy Biologicheskoy, Meditsinskoy I pharmacevticheskoy khimii. 2012; 10: 16–20 (in Russian))
18. Короленкова Л.И., Кушлинский Д.Н., Герштейн Е.С. и соавт. Инсулиноподобные факторы роста сыворотки крови больных цервикальной интраэпителиальной гиперплазией и инвазивным раком шейки матки как перспективные маркеры прогрессии заболевания. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012; 10: 21–35. (Korolenkova L.I., Kushlinsky D.N., Gershtein E.S. et al. Serum insulin-like growth factors 1 and 2 and insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3 in CIN and invasive cervical cancer as perspective markers of disease progression. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i pharmacevticheskoy khimii. 2012; 10: 21–35 (in Russian))
19. Baron-Hay S., Boyle F., Ferrier A., Scott C. Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 as a prognostic marker in patients with ovarian cancer. Clin. Cancer Res. 2004; 10 (5): 1796–806.
20. Katsaros D., Yu H., Levesque M.A. et al. IGFBP-3 in epithelial ovarian carcinoma and its association with clinico-pathological features and patient survival. Eur. J. Cancer. 2001; 37 (4): 478–85.
21. Waksmanski B., Dudkiewicz J., Kowalski T. Changes in insulin-like growth factor I, 17-b-estradiol, and progesterone in postmenopausal women with benign and malignant ovarian tumours. Med. Sci. Monit. 2001; 7 (5): 919–23.
22. Peeters P.H., Lukanova A., Allen N. et al. Serum IGF-I, its major binding protein (IGFBP-3) and epithelial ovarian cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). Endocr. Relat. Cancer. 2007; 14 (1): 81–90.
23. Tworoger S.S., Lee I.M., Buring J.E. et al. Insulin-like growth factors and ovarian cancer risk: a nested case-control study in three cohorts. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007; 16 (8): 1691–5.

Поступила 14 мая 2014 г.

© **Коллектив авторов**, 2014
УДК 616.5-006.81-033.2-092:[612.6.05:577.21

НЕКОТОРЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Е.Г. Зенит-Журавлева, **А.А. Лушникова**, доктор биологических наук, **Д.А. Понкратова**, **И.В. Цыганова**, кандидат биологических наук, **И.Н. Михайлова**, доктор медицинских наук, **Е.А. Черемушкин**, кандидат медицинских наук, **А.С. Вихрова**, **Е.М. Трещалина**, доктор медицинских наук, профессор, **Л.В. Демидов**, доктор медицинских наук, профессор, **Н.Н. Мазуренко**, доктор биологических наук, профессор

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Российская Федерация, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24

E-mail: LAN21@yandex.ru

Введение. *Частота меланомы кожи (МК) в мире постоянно растет. Диагностика и лечение МК на ранних стадиях позволяет увеличить 5-летнюю выживаемость пациентов до 90%. Эту проблему можно решить с помощью персонализированной таргетной терапии, направленной на ключевые сигнальные пути и сигнальные молекулы, к которым относятся онкогены BRAF/NRAS/KRAS и белки с шаперонной активностью нуклеолин/С23 (ген NCL) и нуклеофозмин/В23 (ген NPM).*

Цель исследования *– анализ структурных изменений генов NCL и NPM, а также наиболее частых мутаций генов BRAF/NRAS/KRAS в клинически охарактеризованных образцах метастатической МК и в подкожных ксенографтах МК человека, которые могут служить моделями для исследования механизмов канцерогенеза и эффективности таргетной терапии.*

Методы. *Структурные изменения в генах NCL и NPM определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) всех экзонов и прилегающих интронов, последующего конформационно-чувствительного электрофореза ампликонов в ПААГ и их прямого секвенирования; мутации генов BRAF/NRAS/KRAS – с помощью ПЦР и последующего прямого секвенирования ПЦР-продуктов. Проанализировано 30 образцов метастатической МК различных гистологических типов, 2 образца ксенографтов МК и 30 образцов ДНК доноров (группа контроля).*

Результаты. *В образцах МК впервые обнаружен ряд структурных изменений генов NPM и NCL, кодирующих основные аргирофильные белки нуклеофозмин/В23 и нуклеолин/С23. Эти изменения выявлены в нескольких экзонах и прилегающих к ним интронах генов NCL/NPM, часть из них специфична для МК и не обнаруживается в норме (группа контроля). Комплекс генетических изменений, затрагивающих NCL, NPM, BRAF, NRAS/KRAS и, возможно, другие локусы, создает генетическую нестабильность и молекулярную неоднородность опухоли, порождающие агрессивное течение заболевания и трудности терапевтического воздействия на МК. Обсуждаются возможные механизмы активации ключевых сигнальных путей с участием изучаемых белков и онкогенов.*

Заключение. *Выявлен и охарактеризован комплекс генетических изменений в метастатической МК человека различных гистологических типов. Это важно для изучения механизмов индукции и прогрессии МК, а также открывает перспективы для создания молекулярно-направленных препаратов широкого спектра действия.*

Ключевые слова: *метастатическая меланома кожи, нуклеолин/С23, нуклеофозмин/В23, клеточные онкогены, сигнальные пути, таргетная терапия*

SEVERAL GENETIC FEATURES OF HUMAN METASTATIC CUTANEOUS MELANOMA

E.G. Zenit-Zhuravleva, A.A. Lushnikova, D.A. Ponkratova, I.V. Tsyganova, I.N. Mikhailova, E.A. Cheremushkin, A.S. Vikhrova, E.M. Treschalina, L.V. Demidov, N.N. Mazurenko

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation, 115478

Introduction. *The prevalence of human cutaneous melanoma (CM) in the world is constantly rising. Diagnostics and treatment of CM at the early stages allows to increase the 5-year patient survival up to 90%. This problem can be solved with personalized therapy targeted to the key signaling pathways and driver molecules, involving BRAF/NRAS/KRAS and such argyrophilic proteins with chaperone activity as nucleolin/C23 (encoded by NCL gene) and nucleophosmin/B23 (encoded by NPM gene).*

Objective. *Analysis of NCL/NPM gene structure and the most common BRAF/NRAS/KRAS gene mutations in the clinically characterized samples of the metastatic CM and subcutaneous human CM xenograftsas , considered as a model for study of the mechanisms of carcinogenesis and effectiveness of targeted therapy , have been done.*

Methods. *Some changes in NCL/NPM gene structure were determined by PCR for all gene exons and adjacent introns followed by conformation-sensitive electrophoresis and direct sequencing of PCR products. Mutations of BRAF/NRAS/KRAS genes were detected by PCR followed by direct sequencing of PCR products. 30 CM samples of different histological types, 2 human CM xenografts and 30 donor DNA samples (control group) were analyzed.*

Results. *A number of structural alterations for NPM/NCL genes encoding the main argyrophilic proteins nucleophosmin/B23 and nucleolin/C23 were found. Some of the alterations were revealed in several exons and adjacent introns of NCL/NPM genes. Some combinations of the changes and polymorphic variant in exon 3 of NCL gene were specific for CM and were absent in normal tissue (control group of donors). The complex genetic alterations affecting NCL/NPM, BRAF/NRAS/KRAS genes (and alleged loci), might create genetic instability and molecular heterogeneity of CM that generate tumor aggressiveness and treatment inefficiency. A possible mechanisms for activation of the key signaling pathways, including described oncogenes and proteins have been discussed.*

Conclusion. *A complex genomic alterations in metastatic CM of different histological types were found and characterized. This may be important for mechanisms of CM induction and progression, and for prospective creation of targeted drugs with wide spectrum of the action.*

Key words: *metastatic cutaneous melanoma, nucleolin/C23, nucleophosmin/B23, cellular oncogenes, signaling pathways, targeted therapy*

ВВЕДЕНИЕ

Меланома кожи (МК) – злокачественная опухоль, возникающая в результате неопластической трансформации меланоцитов и меланобластов. В структуре онкологической заболеваемости МК составляет около 2%, однако эпидемиологические данные указывают на увеличение частоты заболеваемости МК. В России за последние 10 лет частота МК выросла на 21,38% у женщин и на 24,34% – у мужчин, составив в среднем 25,4 на 100 тыс., причем ежегодно заболевают более 7700 пациентов, из них около 50% умирают [1].

При неблагоприятном прогнозе метастатической МК однолетняя выживаемость больных с изолированным поражением кожи, подкожной клетчатки и лимфатических узлов составляет 59%, при поражении легких – 57%, при поражении других внутренних органов или при повышении уровня лактатдегидрогеназы – 41%. МК метастазирует во многие органы, часто затрагивая желудочно-кишечный тракт. Нередко наблюдаются метастазы МК в головной мозг; выживаемость таких пациентов не превышает 4 мес. Именно поражение центральной нервной системы обусловливает летальный исход у 50% больных с метастатической МК.

Для МК характерны агрессивное клиническое течение, высокая метастатическая активность и неблагоприятный прогноз. Наиболее важными прогностическими критериями МК являются гистологический тип, толщина опухоли по Бреслоу и ее изъязвление, а также уровень инвазии по Кларку и митотический индекс. В зависимости от клинико-гистологических вариантов МК 5-летняя выживаемость больных варьирует от 58 до 85%. Улучшение выживаемости при МК связывают прежде всего с ранней диагностикой опухолей, расширением спектра иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров, а также разработкой новых методов лечения, включая молекулярно-направленную (таргетную) терапию [2, 3].

Диагностика МК на ранних стадиях (I–II) позволяет увеличить 5-летнюю выживаемость пациентов до 90%. В последнее время для этой цели используется ряд специфичных маркеров, продуцируемых в клетках МК. Более чем в 80% случаев меланомы кожи происходит аберрантная активация МАРК-сигнального пути на уровнях RAS-RAF-MEK-ERK вследствие мутаций в соответствующих генах (рис. 1). Мутации гена *BRAF*, локализованного на хромосоме 7q34 и кодирующего серинтреониновую киназу, обнаруживают в опухолях у 50–70% больных метастатической МК. К настоящему времени известно >100 соматических мутаций гена *BRAF*. В большинстве случаев (до 90% всех мутаций) – это нуклеотидная замена c.1799T>A в экзоне 15, которая приводит к замещению валина на глутаминовую кислоту в позиции 600 полипептида (*V600E/BRAF*). Активация МАРК/ERK-сигнального каскада, опосредованная мутацией *BRAF*, играет ключевую роль в клеточной пролиферации и прогрессии МК. Этот путь активируется также за счет мутаций гена *NRAS* в кодоне *Q61R|K|L* экзона 3, которые обнаруживаются в 15–30% случаев МК. Мутации генов *BRAF* и *NRAS* взаимно исключающие, они выявляются также в доброкачественных (неозлокачествленных) невусах, что свидетельствует о сложном механизме трансформации меланоцитов с участием ряда генов.

В отсутствие драйверных мутаций генов *NRAS* или *BRAF* в МК обнаруживаются мутации генов *KIT, PDGFRA*, а также изменения генов, участвующих в регуляции клеточного цикла: амплификация *CCND1* или *CDK4*, делеция гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2A*(p16) и другие нарушения. Кроме соматических активирующих мутаций генов *BRAF* и *NRAS*, с помощью секвенирования экзона опухолевых клеток в МК идентифицированы мутации гена *RAC1* и герминальные мутации в генах предрасположенности к МК *BAP1* и *MITF*, а также ряд других генетических нарушений, приводящих к активации ключевых сигнальных путей [4].

Достижения в изучении механизмов канцерогенеза МК привели к разработке новых методов лечения, включая молекулярно-направленную (таргетную) терапию. Перспективными оказались таргетные препараты, блокирующие сигнальные каскады, активированные в результате мутаций генов *BRAF, NRAS, KIT, EGFR, CDK2a, PTEN* (см. рис. 1) [5, 6]. Например, молекулярно-направленный препарат вемурафиниб на 63% снижает риск летального исхода (p<0,0001; ОР=0,37) и на 76% – риск ухудшения клинического течения МК, увеличивая выживаемость без прогрессирования. Показано, что вемурафениб активен в отношении всех замен в кодоне *V600E|K* [7, 8]. Однако ингибиторы BRAF могут индуцировать инвазию и метастазирование клеток с мутациями RAS за счет реактивации MEK-ERK-сигнального пути и развития резистентных к терапии опухолей, что требует комбинированного подхода к таргетной терапии МК [9]. В частности, предложена схема комбинированной терапии опухолей с мутациями в гене *BRAF* ингибиторами CRAF, BRAF и MEK [10]. В клетках меланом, резистентных к комбинированной терапии ингибиторами RAF-MEK, были выявлены нарушения циклического аденозинмонофосфат (цАМФ)-зависимого меланоцитспецифичного сигналинга, включающего рецепторы аденилатциклазы, а также реактивации белка CREB, связывающего PtkA и цАМФ, и экспрессия c-FOS, NR4A1/A2 и MITF. Это говорит в пользу активации целых групп онкогенов в клетках меланоцитарного ряда и необходимости терапии, резистентной к таргетным препаратам меланомы, нацеленной на все ключевые сигнальные пути и хроматин [11]. Показаны низкий уровень экспрессии фосфорилированного CRAF и высокий – цАМФ в чувствительных к вемурафенибу клеточных линиях меланомы, а также высокий уровень экспрессии фосфоCRAF, но низкий уровень цАМФ – в резистентных линиях. Поэтому ингибирование CRAF через активацию цАМФ позволило бы преодолеть резистентность к вемурафенибу меланом с генотипами *(WT)BRAF/(WT)NRAS* [12]. Однако около 60% EGFR-позитивных меланом, резистентных к ингибиторам BRAF-MEK-киназ, могут вновь приобрести чувствительность к таргетной терапии, поскольку в гетерогенной популяции клеток меланомы при отсутствии этих ингибиторов резистентные клетки с высоким уровнем экспрессии EGFR и TGFβ не имеют пролиферативных преимуществ перед клетками, чувствительными к ингибиторам [13].

Разработка альтернативных стратегий лечения МК зависит от дальнейшего анализа механизмов индукции МК и создания новых моделей для изучения патогенеза опухоли.

В качестве потенциальных терапевтических мишеней большой интерес представляют многофункциональные аргирофильные белки ядрышковых организаторов нуклеолин/С23 (кодируется геном *NCL*) и нуклеофозмин/В23 (кодируется геном *NPM*). Эти белки локализованы в ядрах клеток и в меньшей степени – в цитоплазме. Одной из важнейших функций С23/В23 является контроль прохождения клеткой сверочных точек (чекпойнтов). Чем выше уровень этих белков в клетке, тем быстрее клетка проходит клеточный цикл, медленнее дифференцируется и наоборот. Нуклеолин и нуклеофозмин регулируют такие ключевые процессы, как биогенез рибосом, транскрипция и трансляция, клеточный сигналинг, пролиферация и апоптоз. В основе этой регуляции лежит межмолекулярное взаимодействие В23 и С23 с множеством белков, включая микро-РНК и белки-супрессоры BRCA1/2 и P53 [14]. Гликированные молекулы С23 входят в состав внеклеточных мембранных белковых комплексов с молекулярной массой 500 кДа, включающих также 2 Wnt-родственных белка, аутоантиген Ku86, распознающие сигнал субъединицы SRP68/72 рецептора комплемента qC1q-R, и рибосомные белки S4/S6, а также пептиды MHC класса I. Молекулы С23 обеспечивают стабильность структуры и функционирование этого комплекса, передачу сигналов клеточной адгезии, миграции, инвазии, регуляцию ангиогенеза и апоптоза, клеточной пролиферации, а также транспорт ионов Ca^{2+} и ряд других функций. Рецепторный С23 считается перспективной молекулярной мишенью для таргетной терапии МК, а также для иммунодиагностики других злокачественных опухолей. Это – основной медиатор для различных лигандов, ассоциированных с онкологической и другой патологией [15–17].

Нуклеофозмин/В23 также является многофункциональным фосфопротеином, в клеточном ядре преобладает полноразмерная изоформа этого белка. От продукции В23 в клетке напрямую зависят транспорт гистонов и сборка хроматина. Резкое изменение уровня В23 индуцирует нарушение митоза, геномную нестабильность и развитие опухолей. В опухолях нередко наблюдаются повышенный уровень экспрессии гена NPM1 и тесное взаимодействие нуклеофозмина/В23 с белками – продуктами онкогенов и генов-супрессоров *c-Fos, c-Myc, p53 Rb, K-Ras* [18]. Локализация нуклеофозмина/В23 в ядрышках и клеточном ядре, его взаимодействие с множеством регуляторных белков и участие в важнейших клеточных функциях указывают на роль нуклеофозмина как атипичного опухолевого супрессора и возможную мишень для таргетной терапии опухолей. Внеядерные молекулы нуклеофозмина и нуклеолина взаимодействуют как с кластером ГДФ-KRAS, так и с ГТФ-KRAS. Однако после активации рецептора фактора роста фракция ГТФ-KRAS нарастает, что приводит к гиперактивации MAPK-сигнального пути [19]. С мутациями в экзоне 12 гена *NPM* ассоциирован фенотип острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), с транслокацией NPM-ALK – анапластическая крупноклеточная лимфома. О структуре генов *NCL* и *NPM* и их экспрессии в клетках метастатической МК пока данных нет.

Цель настоящей работы – анализ структурных изменений генов *NCL* и *NPM*, а также мутаций генов *BRAF* и *NRAS* в клинически охарактеризованных образцах метастатической МК и в подкожных ксенографтах МК человека, которые служат моделями для изучения механизмов канцерогенеза и эффективности таргетной терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В выборке обследованных было 30 больных МК, наблюдавшихся в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН: 18 женщин (возраст в момент постановки диагноза 41 год – 78 лет; средний возраст – 56,0±16,0 года) и 12 мужчин (возраст соответственно 23 года – 68 лет; в среднем – 41,0±19,0 года). Среди гистологических типов наиболее частыми были беспигментные эпителиоидно-клеточные МК (у 16 из 30), пигментные эпителиоидноклеточные (у 4 из 30), МК смешанного типа (у 3 из 30), пигментная узловая МК (у 3 из 30), в единичных случаях – пигментные и беспигментные веретеноклеточные МК. У 2 обследованных обнаружены первично множественные злокачественные образования (ПМЗО). У пациента Б., 68 лет, была диагностирована беспигментная веретеноклеточная МК передней грудной стенки с множественными метастазами в лимфатических узлах с мутацией *BRAFV600E*, а также рак толстой кишки (РТК) и рак правой почки (РП). У больной Ш., 75 лет, диагностирована эпителиоидно-клеточная МК дистальной фаланги IV пальца кисти с метастазами, в анамнезе – диссеминированный рак легкого (РЛ), аденокарцинома с делецией в экзоне 19 *EGFR* (проводилась таргетная терапия ирессой) и гормонопозитивный протоковый рак правой молочной железы (РМЖ, проводилась мастэктомия).

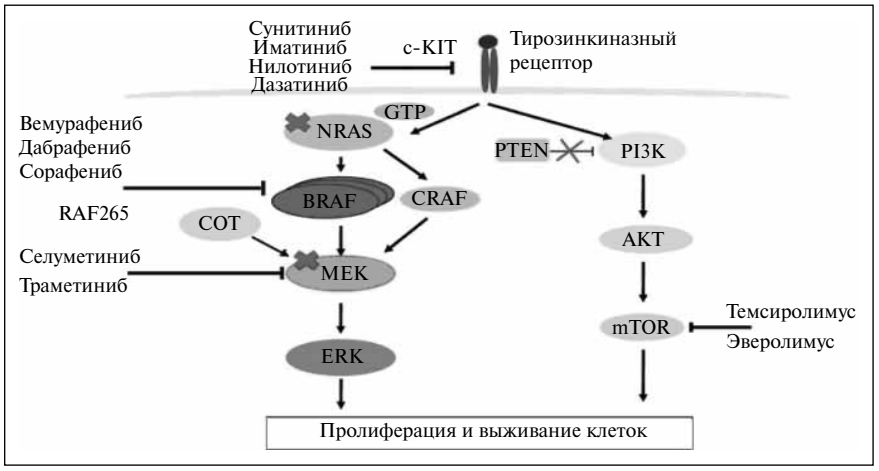

Рис. 1. *Схема действия основных таргетных препаратов на ключевые сигнальные пути, активированные в опухолевых клетках МК*

Исследовали образцы ДНК, выделенной из 30 метастазов МК и 1 первичной МК, полученных от 30 пациентов с МК различной локализации, а также из 2 подкожных ксенографтов (К) штаммов Mel-6 и Mel-7, полученных при пересадке под кожу бестимусных мышей опухолей от 2 больных МК. ДНК выделяли (из свежей опухолевой ткани и в 1 случае – из архивного материала) с помощью набора НК-Проба-Плюс (ООО «ДНК-технология», Москва) по инструкции производителя. На матрице геномной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицировали последовательности генов, кодирующих С23/В23. Для исследования структурных изменений генов *NCL/NPM* были подобраны пары праймеров ко всем кодирующим участкам и прилегающим интронным последовательностям и соответствующие условия ПЦР (табл. 1). Полученные ПЦР-продукты анализировали с помощью конформационно-чувствительного электрофореза и последующего секвенирования измененных вариантов в ООО «Генотех» на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 500. В качестве контрольных образцов использовали ДНК, выделенную из периферической крови здоровых доноров в сопоставимой по возрасту и полу группе (n=30).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемых образцах МК мы обнаружили различные структурные изменения генов *NPM/NCL*: однонуклеотидные замены, интронные структурные варианты и новую герминальную делецию 3 нуклеотидов в экзоне 4 гена *NCL*. Кроме того, были выявлены уже известные полиморфные варианты – ПВ (база данных *Ensembl genome browser/ncbi.nlh.nih.gov/*). Многие из указанных изменений встречались в изученных образцах опухолей неоднократно и были представлены несколькими типами (табл. 2). Сравнение типов структурных изменений в образцах МК и в контроле позволило выявить несколько общепопуляционных ПВ, а также структурные изменения генов *NPM/NCL* и их комбинации, которые не обнаруживаются в контроле (рис. 2).

Изменения в структуре гена *NPM*

Ген *NPM* локализован на хромосоме 5q35.1, содержит 12 экзонов и 11 интронов протяженностью 23181 п.н., известно более 12 псевдогенов. Наряду с полноразмерным белком, молекулы которого содержат 294 аминокислотных остатка, в результате альтернативного сплайсинга образуются еще 2 изоформы В23. Молекула В23/нуклеофозмина содержит уникальные области, ответственные за олигомеризацию, шаперонную активность, связывание с нуклеиновыми кислотами и белками. Мы выявили структурные изменения гена *NPM* в 22 из 30 проанализированных образцов МК. В большинстве случаев они были локализованы в интронах 5 и 6 (всего 17/30) и представлены сочетанием 2 однонуклеотидных замен *IVS5 31A/G + IVS6 42G/A*; в интронах 6 и 8 (8/30 и 6/30 соответственно), представленных однонуклеотидными заменами *IVS6-39A/G + (-42)A/G* и *IVS8 -63A/G* (см. табл. 2). Аналогичные интронные варианты были обнаружены в контроле с сопоставимой частотой (рис. 2). С учетом относительно высокой частоты выявленных генетических изменений, а также их обнаружения в опухолях другой локализации (ксенографты РТК, РЛ и РП, собственные данные) можно предполагать функциональную значимость описан-

Таблица 1

СПИСОК ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЯ ПЦР ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *NCL/NPM* И *BRAF, NRAS И KRAS* С ОБНАРУЖЕННЫМИ СТРУКТУРНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

№	Пары праймеров	Последовательности (5' – 3')	Температура отжига праймеров, °С/длина ампликона, п.н.
1	NPM 7F NPM 7R	AAGTTCCTTTTCCCATGTGC GAACAAGAGCTGTTCTATCACCAA	59/240
2	NPM 8F NPM 8R	ACTTCAAGGTCCTGCTTTC ATGATCTCCCACACCAGCTT	59/240
3	NPM 10F NPM 10R	AGCTTTATAAGGGAGTTTTGTGAGAA AAACATTCAAGTCTATGCAAACCA	59/360
4	NCL 2F NCL 3R	GCGTATGAACACTAATGGCAAA TTGCCACAGATATCCAATTTCA	59/280
5	NCL 3F NCL 3R	GGGGCTGGACTTACTGGTTT CTTGGCATTCTTGCCATTCT	59/320
6	NCL 4F NCL 4R	TGTTGGTTTTGGGAGATTGC CCTCCTTTAAACATAACTCATGTCG	59/280
7	BRAF-Ex15BR-For BRAF_Ex15BR_Rev	ACCTAAACTCTTCATAATGCT ACAACTGTTCAAACTGATGG	56/173
8	Ex3-NRAS_For Ex3-NRAS_Rev	AATTGAACTTCCCTCCCTCCCT AATTGAACTTCCCTCCCTCCCT	68/150
9	Ex2 KRAS-For Ex2 KRAS-Rev KR-shEx2-Rev	ATGACTGAATATAAACTTGTGG TTATCTGTATCAAAGAATGGT TGCATATTAAAACAAGATTTACC	54/153

ных генетических изменений. Дальнейший анализ структуры гена NPM в неизмененной ткани и других образцах МК позволит проверить это предположение.

На С-конце молекулы B23 имеется кластер положительно заряженных аминокислот, ответственный за связывание этого белка с молекулами ДНК и РНК, аденозинтрифосфата, белками ядрышка, а также за транспорт гистонов и рибонуклеазную активность. Показано, что взаимодействие B23 с транскрипционными факторами, белками-супрессорами и другими регуляторными белками с последующими посттрансляционными изменениями приводит к изменению профиля экспрессии этих белков, в частности к увеличению уровня экспрессии протеинкиназы B – pAkt, обусловливающему трансформацию тироцитов и развитие рака щитовидной железы [20]. Метаанализ 106 различных B23-ассоциированных белков выявил 6 прогностически значимых для саркомы Юинга полипептидов, активность которых регулируется нуклеофозмином [21]. Метаанализ с помощью микрочипов уровня экспрессии генов в клетках кишечника в норме, в аденомах и при колоректальном раке (КРР) выявил дифференциальную экспрессию NPM в зависимости от прогрессии опухолей; подавление экспрессии гена NPM в культуре клеток с помощью малых ядерных (мя) РНК приводило к p53-опосредованному аресту клеточного цикла и супрессии опухолевого роста [22]. Более того, профиль экспрессии гена *NPM* в культуре КРР коррелировал с миграцией опухолевых клеток и с их инвазией [23]. Другой механизм канцерогенеза связан с взаимодействием B23 и транскрипционного фактора FOXM1, активирующего транскрипцию целого ряда генов, включая онкогены, что может привести к индукции опухолевого роста [24].

Структурные изменения гена *NPM* могут повлиять на первичную структуру функционально важных доменов, изменяя физико-химические свойства белка и его биологическую активность. Дальнейшая характеристика таких изменений позволит прояснить механизмы B23-опосредованной индукции опухолевого роста.

Изменения в структуре гена *NCL*

Ген *NCL*, кодирующий нуклеолин, картирован на хромосоме 2q37.1, содержит 14 экзонов и 13 интронов протяженностью около 11 т.п.н., интрон 11 кодирует мяРНК U20. Будучи многофункциональным белком, нуклеолин/C23 участвует в регуляции важнейших клеточных процессов, включая транскрипцию, биогенез рибосом, стабилизацию РНК и трансляцию, а также процессинг микроРНК. В молекуле C23 имеется 4 РНК-связывающих домена и обогащенный аргинином/глицином домен, которые взаимодействуют с молекулами РНК и опосредуют клеточную пролиферацию, блок апоптоза с последующим развитием опухолей, генерализацией вирусных инфекций и другими патологическими процессами. На С-конце молекулы C23 локализован домен RGG (GAR) – 9-членный повтор триплета Арг-Гли-Гли, важный для функционирования гликированного рецепторного нуклеолина [25]. Нарушение интактной молекулярной структуры C23, вызванное генетическими изменениями, может иметь критическое значение для индукции неоплазий. В 3 из 30 (10%) проанализированных образцах метастатической МК были выявлены однонуклеотидные замены IVS2+31G/A в интроне 2 гена *NCL* и в 1/30 – уже известный полиморфизм *p. E149E (GAG/GAA)* в экзоне 3, который не встретился в ДНК контрольных образцов и может рассматриваться как специфичный для МК. Эти варианты представляют интерес, поскольку ДНК, не кодирующая белки, по-видимому, функционально значима. Дело в том, что соответствующая некодирующая РНК (нкРНК, ncRNA), может выполнять регуляторные функции, включая опосредованный транскрипцией нкДНК сайленсинг соседних генов и их промоторов – транскрипционную интерференцию. Наличие интронных вариантов гена *NCL* указывает на возможное изменение регуляторных функций в случае нкРНК. Этот вопрос также требует дальнейшего изучения с привлечением обширной выборки больных с метастатической МК.

Впервые обнаруженная нами герминальная делеция del c.763-765 GAT в экзоне 4 гена *NCL* затрагивает обогащенный аспарагином и глутаминовой кислотой домен этого белка, участвующий во взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами и кислыми белками (база данных *Ensembl*). По нашим предварительным данным, частота этой мутации в контрольной группе доноров в 5–6 раз превышает частоту у пациентов с МК. Однако в отличие от доноров, у пациентов с МК делеция встречается в ~15% случаев в сочетании с другими интронными вариантами, например *IVS2+31G/A* и ПВ (синонимичной

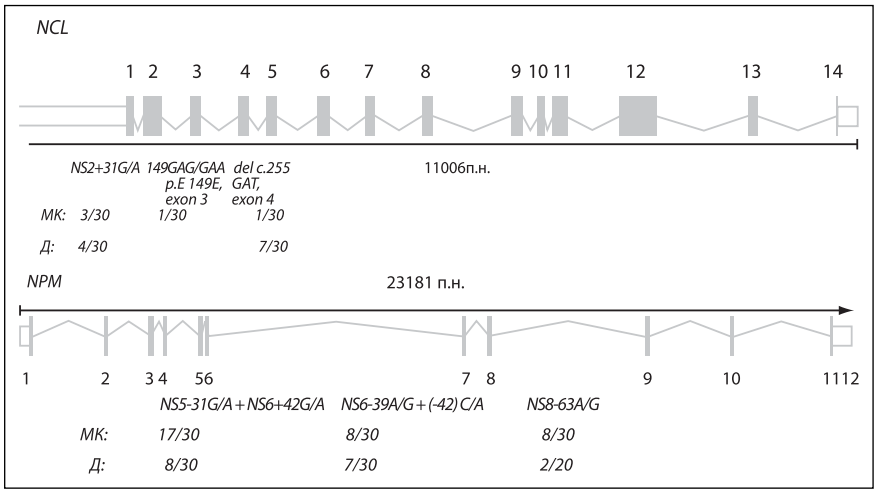

Рис. 2. *Схемы транскриптов генов NCL (вверху) и NPM (внизу); цифрами обозначены экзоны (вертикальные линии), соединенные интронными последовательностями (кривые), которые вырезаются при сплайсинге. Внизу показано количество экзонных структурных изменений и полиморфных интронных вариантов, обнаруженных в ДНК из клеток метастатической МК и в ДНК доноров (Д)*

заменой) *p. E149E (149 GAG/GAA)* в экзоне 3 гена *NCL*. У доноров эта делеция обнаруживается либо в сочетании с *IVS2+31G/A* в интроне 2 гена *NCL*, либо отдельно (примерно в равных пропорциях). Структурный анализ этой мутации в гене *NCL*, затрагивающей функционально важный домен, будет представлен в следующей статье.

Хотя C23 локализован преимущественно в ядрышках, он участвует в ядерно-цитоплазматическом транспорте и высоко экспрессируется на поверхности некоторых типов клеток. Ингибирование активности рецепторного нуклеолина блокирует рост опухолевых клеток молочной железы, предстательной железы и мозга (глиомы) [25]. У пациента Ч., 40 лет – носителя данной мутации, было отмечено 5 рецидивов МК в течение непродолжительного времени наблюдения. Аналогичная картина быстрого прогрессирования опухоли наблюдалась у 2 других пациентов с указанной делецией в гене *NCL*, но без мутации (данные здесь не представлены).

Известно, что фосфорилированый нуклеолин активно взаимодействует с комплексом различных клеточных белков, участвуя в ключевых процессах клеточной жизнедеятельности. Активация C23 приводит к быстрой пролиферации клеток и стимулирует опухолевый рост. Обнаруженные недавно статистически значимые изменения уровня экспрессии *NCL* при немелкоклеточном раке легкого имеют прогностическое значение [26]. Более того, были сконструированы 2 аптамерных молекулярных химеры нуклеолин-мяРНК, ингибирующие экспрессию SLUG/NRP1 и опухолевый рост модельных ксенографтов РЛ [27].

Мультифакторный анализ выявил прогностическую значимость экспрессии *NCL* для ряда других неоплазий, включая детские эпендимомы, а также остеосаркомы и глиомы [28]. Показано, что взаимодействие С-концевого аргинин-глицин-богатого домена C23 с коактиватором β-рецептора ретиноевой кислоты COUP-TFII создает основу для инвазивного роста опухоли при протоковом раке молочной железы (РМЖ) [29]. Неспецифический механизм индукции канцерогенеза заключается, по-видимому, в активации за счет гиперпродукции C23 роста эндотелиальных клеток и стимуляции ангиогенных факторов роста, например плейотропина [30]. Альтернативный механизм заключается во взаимодействии молекул C23 с активатором плазминогена урокиназного типа (uPAR), благодаря которому активатор переносится в ядро и участвует в регуляции генной экспрессии [31]. Отметим, что молекулы C23 и интегрина являются рецепторами интегрина α5β1, опосредующего экспрессию uPAR так, что комплекс C23/α5β1/uPAR способствует интернализации и транспорту эндостатина в клеточное ядро. Особый интерес вызывают исследования роли C23 в развитии меланомы [17, 19].

Активированные молекулы RAS и рецептор ErbB1 семейства эпидермальных факторов роста взаимодейству-

Таблица 2

ТИПЫ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕНОВ *NPM/NCL* И СПЕЦИФИЧНЫЕ МУТАЦИИ *BRAF/NRAS/KRAS* В ОБРАЗЦАХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МК

Тип	Ген	Изменение	Частота обнаружения	Комбинации генетических изменений *NPM/NCL* и мутаций в образцах МК
1	*NPM, интроны 5–6*	Одновременно *IVS5-31G/A* и *IVS6 + (-42)G/A*	17 (57%) образцов и 1 ксенографт	*тип 1 + BRAF V600E*, включая *1BRAF V600K*: 8 (27%) образцов: из них 5 (17%): *тип 1 + V600E BRAF + тип 4 и тип 5 (NCL)*; 2 образца: *тип 1 + Q61R NRAS*; 1 образец: *тип 1 + G13D KRAS*
2	*NPM, интрон 6*	Однонуклеотидная замена *IVS6 -39 A/G + тип 1*	8 (26%) образцов МК	4 (13%) образца: *тип 2 + BRAF V600E + тип 4 (NCL) + тип 5 (NCL)*
3	*NPM, интрон 8*	Однонуклеотидная замена *IVS8-63A/G + тип 1*	6 (20%) образцов	5 (16%) образцов: *тип 3 + BRAF V600E*, 2 (6%) образца: *тип 3 + Q61R NRAS*
4	*NCL, интрон 2*	Однонуклеотидная замена *IVS2+31G/A*	4 (13%) образца	*Тип 4 + BRAF V600E + тип 1 (NPM)* (все 4 образца – быстро рецидивирующая МК)
5	*NCL, экзон 3*	Однонуклеотидная замена (ПВ) *p. E149E (GAG/GAA)*	7 (23%) образцов	6 (20%) образцов: *тип 5 + BRAF V600E + тип 1*; 1 образец: *тип 5 + Q61R NRAS*
6	*NCL, экзон 4*	*Del c.255 (763-765 GAT) + тип 4*	1 образец	*E149E (149GAG/GAA)* + герминальная делеция в экзоне 4 *NCL*, семейное отягощение, 5 рецидивов МК
7	*BRAF*	*BRAF V600E*	15 (50%) образцов 1 из 2 ксенографтов	13 (43%) образцов: эпителиоидно-клеточная МК с множественными метастазами, 1/30 – веретеноклеточная МК; 1/30 – ПМЗО: МК+РТК+РП
8	*BRAF*	*BRAF V600K*	1 образец	Рецидивирующая МК с замещением лимфоидной ткани опухолью
9	*NRAS*	*NRAS Q61R*	3 образца	2 образца – рецидивирующие узловые МК спины
10	*KRAS*	*KRAS G13D*	1 образец	ПМЗО: МК+РЛ+РМЖ

ют с молекулами С23, обеспечивая 3-мерный рост клеток меланомы, пересаженных под кожу иммунодефицитных мышей [25]. Поэтому разработка С23-молекулярно-направленных препаратов перспективна для ингибирования опухолевого роста, индуцированного при активации ряда онкогенов и клеточных рецепторов [32].

Мутации гена *BRAF*

Соматические мутации гена *BRAF* наблюдаются в 40–88% случаев МК, наиболее распространена мутация *BRAF V600E* в экзоне 15. Наличие мутаций гена *BRAF* указывает на неблагоприятный прогноз: более ранний возраст начала заболевания, высокую частоту местных рецидивов с поражением регионарных лимфатических узлов (ЛУ) и инвазией опухоли в глубокие слои кожи, быстрый рост опухолей и низкую выживаемость пациентов. В исследованной нами выборке мутации в экзоне 15 *BRAF* обнаружены в 15 из 30 (50%) случаев: в 12 из них выявлена типичная замена *V600E*, в 1 – обнаружена мутация *BRAFV600K*. У всех носителей этих мутаций гена *BRAF* были диагностированы множественные метастазы в ЛУ, а в ряде случаев – в легкие и печень. У пациентки Т., 50 лет, мутация *BRAF V600E* была обнаружена в первичной опухоли, а также в метастазах МК в ЛУ и легких. В 15 из 30 образцов МК мутация *V600EBRAF* сочеталась со структурными изменениями в интронах 5, 6 и 8 гена *NPM*, включая образец с ПВ в экзоне 3 гена *NCL* (см. табл. 2). В 3 образцах эпителиоидно-клеточной МК спины с множественными метастазами в лимфоузлы и замещением лимфоидной ткани, мутация *V600E BRAF* сочеталась с изменениями сразу в 2 генах – *NPM* (интроны 5, 6 и 8) и *NCL* (интрон 2 и экзон 3). В 1 из 2 образцов метастатической МК в составе ПМЗО (МК + РТК + РП) мутация *V600E BRAF* сочеталась с ПВ *IVS 6 -39A/G + (-42)C/A* в интроне 6 гена *NPM*, а в другом случае (МК + РЛ + РМЖ) герминальные мутации в экзоне 2 гена *KRAS* и в экзоне 19 *EGFR* сочетались с ПВ *p. E149E (149 GAG/GAA)* в экзоне 3 гена *NCL*. Предполагается, что мутации гена *BRAF* в метастатических очагах МК, в отличие от первичной МК, ассоциированы с ухудшением прогноза заболевания и снижением общей выживаемости [33]. По-видимому, сочетание этих мутаций со структурными изменениями ключевых для клеточной пролиферации и сигналинга генов *NCL/NPM* вносит дополнительный вклад в прогрессию МК посредством активации в клетках ключевых сигнальных путей.

Мутации онкогенов *RAS*

Семейство онкогенов *RAS* кодирует малые ГТФазы, передающие внеклеточные сигналы и регулирующие ключевые процессы в клетке: рост, дифференцировку, подвижность и апоптоз. Активированная в результате мутаций изоформа *NRAS* участвует в RAS/RAF/MAPK-зависимом клеточном сигналинге, индуцируя клеточную пролиферацию и прогрессию опухолей. Мутации гена *NRAS* обнаруживаются в 5–33% случаев МК. Нанокластеры Ras-GTP также участвуют в рекрутировании на плазматической мембране комплексов Raf/MEK и ERK и в индукции/активации MAPK-сигнального каскада [19].

Молекулы B23 и C23 специфически связываются с молекулами K-Ras, но не с H-Ras на внутренней стороне клеточной мембраны, это взаимодействие является критическим для MAPK-зависимого сигналинга. О взаимодействии B23/C23 с N-RAS известно значительно меньше. Мутация *Q61R NRAS* была обнаружена нами в 3 из 30 образцов МК, включая 2 образца рецидивирующей узловой МК спины с метастазами в ЛУ, легких и печени (в 1 случае). В 2/3 образцов (МК с метастазами в ЛУ и легких) мутация гена *NRAS* сочеталась со структурными изменениями в экзонах 7 и 10 гена *NPM* (типы 1 и 3; см. табл. 2). Мутация *G13D KRAS* была идентифицирована в 1 из 30 образцов МК у пациентки с ПМЗО (МК + РЛ + РМЖ) в сочетании с герминальной мутацией гена *EGFR*, ПВ в интроне 6 гена *NPM* и специфичным ПВ в экзоне 3 гена *NCL*, не встречающимся в контрольной популяции доноров. Отметим, что последовательности экзонов 3–4 кодируют домены С23, ответственные за взаимодействие с РНК, ДНК и гистоновыми белками. Эта активность нуклеолина важна для удаления нуклеосомных гистонов H2A/H2B и H3/H4 при репарации двуцепочечных разрывов ДНК в фазе G1 клеточного цикла. Нуклеолин регулирует трансляцию мРНК, связываясь с G-богатыми мотивами или с UTR, путем деацетилирования мРНК в комплексе с поли(А)-связывающим белком (PABPC) и тем самым усиливает экспрессию ряда онкобелков.

Для модуляции нуклеолин-зависимой экспрессии ряда микроРНК, ассоциированных с прогрессией РМЖ, предложено использовать синтетические аптамеры с высоким содержанием гуанозина, ингибирующие активность рецепторного нуклеолина [34]. Для меланомы разрабатывается другой оригинальный подход с использованием РНК-связывающей активности нуклеолина [35]. Таким образом, многофункциональный шаперон нуклеолин является перспективной мишенью для молекулярно-направленной терапии ряда опухолей, включая МК.

В настоящее время рассматривается несколько подходов к анализу ключевых сигнальных путей и нарушений их регуляции, которые приводят к развитию меланомы: 1) поиск мутаций в генах-мишенях и регуляторных белков-маркеров прогрессии МК; 2) создание фармакологических агентов для таргетной терапии сигнальных молекул; 3) анализ лекарственной устойчивости и механизмов индукции МК; 4) изучение механизмов резистентности МК к лекарственной терапии [36]. Комплексный анализ генетических изменений при метастатической МК создает основу для развития всех этих направлений клинической онкологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие эффективных методов лечения метастатической МК делает особенно актуальным поиск и характеристику молекулярно-генетических маркеров прогрессии.

Анализ образцов метастатической МК с помощью специфичной ПЦР, конформационно-чувствительного электрофореза и последующего секвенирования ПЦР-продуктов позволил нам обнаружить ряд генетических изменений генов *NPM* и *NCL*, кодирующих B23/нуклеофозмин и C23/нуклеолин. Выявлены специфичные изменения в экзоне 3 гена *NCL* и характерные для образцов метастатической МК сочетания структурных вариантов

с делецией в экзоне 4 гена *NCL*. Выявленные в исследованной выборке пациентов (n=30) и в контрольной группе (n=30) изменения гена NPM не отличались по своей структуре, за исключением полиморфизма в экзоне 3 гена *NCL*, т.е. были неспецифичными. Однако в образцах метастатической МК были обнаружены специфичные комбинации указанных ПВ друг с другом и с мутациями онкогенов *BRAF/NRAS*. Совокупность этих структурных изменений нужно рассматривать в связи с функциональной активностью B23/C23 и динамикой клеточных процессов в целом. При этом возможно изменение структуры функционально важных доменов с последующей деструкцией или стабилизацией молекул, а также посттрансляционными изменениями с участием микроРНК и длинных некодирующих РНК. Дальнейший структурно-функциональный анализ генов *NPM/NCL* важен для понимания механизмов индукции и прогрессии злокачественной МК. Комплекс генетических изменений, включая гены *NCL, NPM, BRAF, NRAS* и, возможно, другие локусы, создает генетическую нестабильность и молекулярную неоднородность опухоли, в частности стволовых опухолевых клеток с повышенным метастатическим потенциалом. Это способствует агрессивному течению заболевания и создает трудности для эффективной терапии МК.

Характеристика найденных изменений в ключевых генах *NPM/NCL*, кодирующих многофункциональные регуляторные белки, с использованием как клинического материала, так и модельных систем, например ксенографтов МК у иммунодефицитных мышей имеет важное значение. Она позволила бы уточнить механизмы онкогенеза МК и определить новые стратегии лечения для диссеминированной МК, которая стоит сейчас в первом ряду заболеваний, перспективных для таргетной терапии [37].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2011 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2013. (Malignant neoplasms in Russia in 2011 (morbidity and mortality). Eds. V.I. Chissov, V.V. Starinsky, G.P. Petrova. Moscow. 2013 (in Russian))
2. Демидов Л.В., Соколов Д.В., Булычева И.В. Совершенствование методов диагностики меланомы кожи. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2007; 18 (1): 36–41. (Demidov L.V., Sokolov D.V., Bulytcheva I.V. Improvement of diagnostics methods for cutaneous melanoma. Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the RAMN. 2007; 18 (1): 36–41 (in Russian))
3. Зенит-Журавлева Е.Г., Полковниченко Е.М., Лушникова А.А., Трещалина Е.М., Букаева И.А., Райхлин Н.Т. Нуклеофозмин и нуклеолин: кодирующие гены и экспрессия в различных тканях человека и животных. Молекулярная медицина. 2012; 4: 24–30. (Zenit-Zhuravleva E.G., Polkovnichenko E.M., Lushnikova A.A., Treschalina H.M., Bukaeva I.A., Raikhlin N.T. Nucleophosmin and nucleolin: coding genes and expression in various tissues of humans and animals. Molecular Medicine. 2012; 4: 24–30 (in Russian))
4. Bello D.M., Arjyan Ch.E., Carvajal R.D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. Cancer Control. 2013; 29 (4): 261–81.
5. Olszanski A. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma. J. Manag. Care Pharm. 2014; 20 (4): 346–56.
6. Tsao H., Chin L., Garraway L.A., Fisher D. Melanoma: from mutations to medicine. Genes Dev. 2012; 26 (11): 1131–55.
7. Lemech Ch., Infante J., Arkenau H-T. The potential for BRAF V600 inhibitors in advanced cutaneous melanoma: rationale and latest evidence. Ther. Adv. Med. Oncol. 2012; 4 (2): 61–73.
8. Woodman S.E., Lazar A.J., Aldape K.D. et al. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease? Clin. Cancer Res. 2012; 18: 1195–200.
9. Asundi J., Lacap J.A., Clark S. et al. MAPK pathway inhibition enchances the efficacy of an anti-endothelin B receptor drug conjugate by inducing target expression in melanoma. Mol. Cancer Ther. 2014; PMID: 24651527.
10. Sullivan R.J., Flaherty K. MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. Oncogene. 2013; 32 (19): 2373–79.
11. Johannesen C.M., Johnson L.A., Piccioni F. et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. Nature. 2013; 504: 138–42.
12. Krayem M., Journe F., Wiedig M. Prominent role of cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in the sensitivity of (WT)BRAF/(WT) NRAS melanoma cells to vemurfenib. Eur. J. Cancer. 2014; 50 (7): 1310–20.
13. Sun C., Wang I., Huang S. et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF (V600E) inhibition in melanoma. Nature. 2014; 508 (7994): 118–22.
14. Wu D.M., Zhang P., Liu R.Y. et al. Phosphorilation and changes in the distribution of nucleolin promote tumor metastasis via the PI3K/Akt pathway in colorectal carcinoma. FEBS Lett. 2014; doi:10.1016/j.febslet.2014.03.047.
15. Abdelmohsen K., Gorospe M. RNA-binding protein nucleolin in disease. RNA Biol. 2012; 9 (6): 799–808.
16. Fujiki H., Watanabe T., Suganuma M. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands. J. Cancer Clin. Oncol. 2014; 140: 689–99.
17. Hoja-Lukowich D., Przybylo M., Poche E. et al. The new face of nucleolin in human melanoma. Cancer Immunol. Immunother. 2009; 58 (9): 1471–78.
18. Li L., Hou J., Liu X. et al. Nucleolin – targeting liposomes guided by aptamer AS 1411 for delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas. Biomaterials. 2014; 35 (12): 3840–50.
19. Inder K.L., Lau C., Loo D. et al. Nucleophosmin and nucleolin regulate K-Ras plasma membrane interactions and MAPK signal transduction. J. Biol. Chem. 2009; 284: 28410–19.
20. Piantaa A., Pyppina C., Franzonib A. et al. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010; 397 (3): 499–504.
21. Haga A., Ogawara Y., Kubota D. et al. Interactomic approach for evaluating nucleophosmin–binding proteins as biomarkers for Ewing sarcoma. Electrophoresis. 2013; 34 (11): 1670–78.
22. Wong J.C., Hasan M.R., Rahman R. et al. Nucleophosmin 1, upregulated in adenoma and cancers of the colon , inhibits p53-mediated cellular senescence. Int. J. Cancer. 2013; 133 (7): 1567–77.
23. Liu Y., Zhang X-F., Qi L-Sh. et al. Expression of nucleophosmin /NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells. J. Biochem. Sci. 2012; 19: 53–59.
24. Bhat U.G., Jagadeeswaran R., Halasi M., Gartel A.L. Nucleophosmin interacts with FOXM1 and modulates the level and localization of FOXM1 in human cancer. J. Biol. Chem. 2011; 286 (48): 41425–33.
25. Schokorov S., Juster D., Kloog Y., Pinkas-Kramardki R. Disruption the oncogenic synergism between nucleolin and Ras results in cell growth inhibition and cell death. PLoS One. 2013; 8 (9): e 75269. doi 10.1371.
26. Zao H., Huang Y., Xue C. et al. Prognostic significance of the combined score of endothelial expression of nucleolin and CD31 in surgically resected non-small cell lung cancer. PLoS One. 2013; 8 (1) doi: 10.1371.
27. Lai W.Y., Wang W.Y., Chang Y.C. et al. Synergistic inhibition of lung cancer cell invasion, tumor growth and angiogenesis using aptamer-siRNA chimeras. Biomaterials. 2014; 35 (9): 2905–14.
28. Modena P., Buttarelli F.R., Miceli R. et al. Predictors of outcome in an AIEOP series of childhood ependymomas: a multifactorial analysis. Neuro Oncol. 2012; 14 (11): 1346–59.
29. Lichfield L.M., Riggs K.A., Hockerberry A.M. et al. Identification and characterization of nucleolin as a COUP-TFII coactivator of retinoic acid receptor β transcription in breast cancer cells. PLoS One. 2012; 7 (5): 131–7.
30. Koutsioumpa M., Papadimitriou E. Cell surface nucleolin as a target for anti-cancer therapies. Recent Pat. Anticancer Drug Discov. 2013; Nov 18. PMID: 24251811.
31. Stepanova V., Lebedeva T, Kuo A. et al. Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator. Blood. 2008; 112 (1): 100–10.
32. Birmpas C., Briand J.P., Courty J., Katsoris P. The polypeptide HB-19 binds to cell surface and inhibits angiogenesis. Vasc. Cells. 2012; 4 (1): 4–21.
33. Amaria R.N., Kim K.B. Dabrafenib for the treatment of melanoma. Expert. Opin. Pharmacother. 2014; Apr 10. (Epub ahead of print)
34. Pichiorri F., Paimieri D., De Luca L. et al. *In vivo* NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. J. Exp. Med. 2013; 6 (5): 951–68.
35. Li L., Hou J., Liu X. et al. Nucleolin – targeting liposomes guided by aptamer AS 1411 for delivery of siRNA for the treatment of malignant melanomas. Biomaterials. 2014; 35 (12): 3840–50.
36. Evans M.S., Madhanapandhula S.V., Robertson G.P. et al. Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma. Adv. Exp. Med. Biol. 2013; 799 (2): 223–55.
37. Jarkowski A., Khushalani N.I. BRAF and beyond: tailoring strategies for the individual melanoma patient. J. Carcinog. 2014; 13 (1): 1–14.

Поступила 16 мая 2014 г.