МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА
Научно-практический журнал

СОДЕРЖАНИЕ

6/2013

ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

Кушлинский Н.Е.,Тимофеев Ю.А., Герштейн Е.С.
Система RANK/RANKL/OPG при метастазах и первичных новообразованиях костей 3

ОБЗОРЫ

Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Адамян Л.В., Терешкина И.В., Лактионов К.П.
Матриксные маталлопротеиназы и их тканевые ингибиторы
в клиническом течении и прогнозе рака яичников 11

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 21

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Герштейн Е.С., Грицаенко Е.В., Терешкина И.В., Огнерубов Н.А., Кушлинский Н.Е.
Фактор роста эндотелия сосудов и компоненты системы активации плазминогена
в опухолях больных раком эндометрия: клинико-морфологические корреляции 27

**Ажигова Р.Р., Кузнецова О.М., Галдава Д.Э.,
Дворова Е.К., Лактионов К.П., Березов Т.Т.**
Клиническое значение рецепторов эпидермального фактора роста
и половых стероидных гормонов в опухолях эндометрия 33

**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 39

Манухин И.Б., Шарашенидзе О.А., Ермилова В.Д., Крюк Ю.В., Костылева О.И.
Содержание рецепторов эпидермального фактора роста
и их лигандов в опухолях яичников 44

Делекторская В.В., Козлов Н.А., Чемерис Г.Ю.
Степень злокачественности и прогноз высокодифференцированных
нейроэндокринных опухолей желудочно-кишечного тракта 49

**Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Гагарин И.М.,
Чуев Ю.В., Мочальникова В.В., Коломейцева А.А., Горбунова В.А.**
Мутации *EGFR* и *KRAS*, важные для таргетной
терапии немелкоклеточного рака легких 55

**В.М. Друх, М.А. Пальцев, В.И Киселев, И.Н. Кузнецов, Л.А. Ашрафян,
Е.Л. Муйжнек, О.И. Пчелинцева**
Изучение токсических и аллергизирующих свойств новой фармацевтической
композиции дииндолилметана 60

НОВОСТИ НАУКИ 64

Главный редактор
М.А. Пальцев
академик РАН и РАМН

Редколлегия журнала

ответственный секретарь
Н.Н. Белушкина д.б.н., профессор

К.В. Анохин чл.-корр. РАН и РАМН
А.В. Васильев д.б.н., профессор
А.И. Григорьев академик РАН и РАМН
А.Д. Дурнев чл.-корр. РАМН
И.М. Кветной д.м.н., профессор
В.И. Киселев чл.-корр. РАМН
Л.С. Коков чл.-корр. РАМН
Н.Е. Кушлинский чл.-корр. РАМН
Е.М. Пальцева д.м.н.
В.О. Попов чл.-корр. РАН
Е.С. Северин чл.-корр. РАН
С.Е. Северин чл.-корр. РАМН
Д.А. Сычев д.м.н., профессор

Редакционный совет

А.И. Арчаков академик РАМН
В.А. Быков академик РАМН
А.Н. Коновалов академик РАН и РАМН
В.П. Скулачев академик РАН
В.Н. Смирнов академик РАМН, чл.-корр. РАН
В.А. Ткачук академик РАН и РАМН
А.А. Тотолян чл.-корр. РАМН
Р.М. Хаитов академик РАН и РАМН
Н.А. Яицкий академик РАМН

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.
Журнал выходит 6 раз в год

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

Редактор **Г.А. Суворова**
Корректор **М.Е. Щербакова**
Верстка **Р.Р. Саргсян**
Компьютерный набор **Е.А. Козловская**

Выход в свет
Формат 60×90/8.
Заказ 73.
Цена свободная

Отпечатано в ООО «Офсет Принт», 127550,
Москва, Дмитровское ш., д. 39, корп. 1.

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: 8-499-246-81-90
Отдел подписки: 8-499-246-79-83
Web-site: www.rusvrach.ru

Подписной индекс
по каталогу Роспечать
для индивидуальных подписчиков 82141
для организаций 82142

MOLECULAR MEDICINE
Scientific journal

CONTENT

6/2013

EDITORIAL

Kushlinskii N.E., Timofeev Yu.A., Gershtein E.S.
RANK/RANKL/OPG system in bone metastases and primary bone tumors 3

REVIEWS

Gershtein E.S., Kushlinsky D.N., Adamyan L.V., Tereshkina I.V., Laktionov K.P.
Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors
in ovarian cancer clinical course and prognosis. 11

Chesnokov M.S., Shavochkina D.A., Gorev A.D., Lazarevich N.L.
Molecular biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma
and their usefulness in clinical practice 21

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Gershtein E.S., Gritsaenko E.V., Tereshkina I.V., Ognerubov N.A., Kushlinskii N.E.
Vascular endothelial growth factor and components of plasminogen
activation system in endometrial cancer: clinico-morphological correlations 27

Azhigova R.R., Kuznetsova O.M., Galdava D.E.,
Dvorova E.K., Laktionov K.P., Berezov T.T.
Clinical significance of epidermal growth factors
and sex steroids in endometrial tumors 33

Shramko S.V., Leshchenko A.S., Khvostova E.P.,
Sabantsev M.A., Bazhenova L.G., Gulyaeva L.F.
Molecular characterization of uterine leiomyoma according
to expression of genes of steroid receptors, STS, SULT and PTEN 39

Manukhin I.B., Sharashenidze O.A., Ermilova V.D., Kryuk Yu.V., Kostyleva O.I.
Content of epidermal growth factor receptors and its ligands in ovarian tumors 44

Delektorskaya V.V., Kozlov N.A., Chemeris G.Yu.
Grade of malignancy and prognosis of well-differentiated
neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract 49

Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Gagarin I.M.,
Chuev I.V., Mochalnikova V.V., Kolomeytseva A.A., Gorbunova V.A.
EGFR and *KRAS* mutations important
for non-small cell lung cancer targeted therapy. 55

V.M. Druh, M.A. Paltcev, V.I. Kiselev, I.N. Kuznetsov, L.A. Ashrafyan, E.L. Muyjnek, O.I. Pchelintseva
The study of toxic and allergenic properties of the new pharmaceutical composition
of diindolylmethane 60

SCIENCE NEWS 64

Editor-in-chief
M.A. Paltsev
acad. of RAS, RAMS

Editorial board

Executive secretary
N.N. Belushkina professor

K.V. Anokhin corr. memb. of RAS, RAMS
A.V. Vasilev professor
A.I. Grigorev acad. of RAS, RAMS
A.D. Durnev corr. memb. of RAMS
I.M. Kvetnoy professor
V.I. Kiselev corr. memb. of RAMS
L.S. Kokov corr. memb. of RAMS
N.E. Kushlinsky corr. memb. of RAMS
E.M. Paltseva d. med. s.
V.O. Popov corr. memb. of RAS
E.S. Severin corr. memb. of RAS
S.E. Severin corr. memb. of RAMS
D.A. Sychev professor

Editorial committee

A.I. Archakov acad. of RAMS
V.A. Bykov acad. of RAMS
A.N. Konovalov acad. of RAS, RAMS
V.P. Skulachev acad. of RAS
V.N. Smirnov acad. of RAMS, corr. memb. of RAS
V.A. Tkachuk acad. of RAS, RAMS
A.A. Totolyan corr. memb. of RAMS
R.M. Khaitov acad. of RAS, RAMS
N.A. Yaitsky acad. of RAS, RAMS

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.
Published 6 times a year

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

Editor **G.A. Suvorova**
Proof-reader **M.Ye. Scherbakova**
Maker-up **R.R. Sargsyan**
Computerized compositor **Ye.A. Kozlovskaya**

Signed for publication
Format 60x90/8.
Order 73

Printed at the «Ofset Print» printing-house:
39, Dmitrovskoe chausse, Moscow, 127550

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

E-mail: belushkina@rambler.ru
E-mail: verstka@rusvrach.ru
Secretariat: 8-499-246-81-90
Subscription department: 8-499-246-79-83
Web-site: www.rusvrach.ru

Rospechat catalogue subscription index
for individual subscribers 82141
for organisations 82142

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.71-006.04-092

СИСТЕМА RANK/RANKL/OPG ПРИ МЕТАСТАЗАХ И ПЕРВИЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ КОСТЕЙ

Н.Е. Кушлинский, член-корреспондент РАМН, профессор,
Ю.А. Тимофеев, **Е.С. Герштейн**, доктор биологических наук, профессор
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Система RANK/RANKL/OPG – ключевое звено гомеостаза костной ткани. В обзоре рассматриваются основные принципы функционирования данной системы, известные генетические аномалии, затрагивающие ее компоненты, а также описываются клинические состояния, ассоциированные с патологией системы RANK/RANKL/OPG. Обсуждается роль указанной системы в развитии метастазов в кости и при первичных новообразованиях костей.
Ключевые слова: *RANK, RANKL, OPG, опухоль, метастазы, кости*

RANK/RANKL/OPG SYSTEM IN BONE METASTASES AND PRIMARY BONE TUMORS
N.E. Kushlinskii, Yu.A. Timofeev, E.S. Gershtein
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

RANK/RANKL/OPG system – is a key element in bone homeostasis. In this review we depict the basic principles of functioning of this system and known genetical anomalies affecting its components. Also we describe a number of pathological states associated with disorders in RANK/RANKL/OPG system and consider the role of this system in development of bone metastases and in primary bone tumors.
Key words: *RANK, RANKL, OPG, tumors, metastases, bones*

Система RANK/RANKL/OPG – ключевой регулятор гомеостаза костной ткани. Кость – динамическая ткань, которая постоянно преобразуется под воздействием механических стрессов и гормональных изменений [1]. Нарушения системы RANK/RANKL/OPG участвуют в развитии ряда патологических процессов, связанных с ремоделированием костной ткани, а также онкологическими процессами.

Клетками, отвечающими за контроль костного ремоделирования, являются остеобласты, ответственные за производство нового костного вещества, и остеокласты – специализированные клетки гемопоэтического происхождения, отвечающие за резорбцию неорганического и органического костного матрикса. Функции остеобластов и остеокластов в нормальной костной ткани скоординированы.

Активность остеокластов регулируется множеством цитокинов, включая интерлейкины (ИЛ) 1, 6 и 11, колониестимулирующими факторами, кальциотропными гормонами, в том числе паратиреоидным гормоном (PTH), 1,25-дигидроксивитамином D_3, кальцитонином [2].

Относительно недавно было показано, что ключевым молекулярным звеном в формировании, функционировании и выживании остеокластов является система рецептора активатора ядерного транскрипционного фактора каппа B (RANK), его лиганда RANKL и остеопротегерина (OPG) [3]. RANKL является членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухолей (ФНО; TNF), а RANK – рецептором, родственным рецептору ФНО (TNFR) [4].

Взаимодействие RANKL, экспрессируемого костными стромальными клетками остеобластной линии, и RANK, экспрессируемого предшественниками остеокластов миелоидного происхождения, необходимо для дифференцировки, выживания и активации остеокластов. В экспериментах на моделях подавление как RANK, так и RANKL приводило к значительному остеопетрозу в результате недостаточности остеокластов, а также нарушению резорбции кости [5]. Взаимодействие между RANK и RANKL стимулирует остеокластогенез посредством активации ряда транскрипционных факторов [6, 7].

Другой член суперсемейства TNFR – OPG экспрессируется остеобластами, способен связывать RANKL и, таким образом, является рецепторной ловушкой для данного лиганда. OPG – это растворимый рецептор. Решающая его роль в остеокластогенезе и ремоделировании костной ткани впервые показана на модели трансгенных мышей с чрезмерной экспрессией OPG, у которых наблюдалось увеличение массы костной ткани в результате снижения количества остеокластов. Следовательно, взаимодействие RANKL и OPG ингибирует пролиферацию остеокластов, их дифференцировку, что в конечном

итоге предотвращает резорбцию костной ткани. Механизм действия системы RANK/RANKL/OPG отображен на рис. 1.

Сохранение точного и сбалансированного взаимодействия RANK, RANKL и OPG критично для остеокластогенеза и, как следствие, поддержания гомеостатического ремоделирования костной ткани. Полагают, что данный сигнальный путь может быть нарушен в ходе таких процессов, как остеопороз или опухольиндуцированное разрушение костной ткани.

СЫВОРОТОЧНЫЙ OPG И РАСТВОРИМАЯ ФОРМА RANKL (SRANKL)

OPG является гликопротеином, который циркулирует в крови в форме мономера или гомодимера и может быть связан с RANKL. Он продуцируется различными тканями и органами, включая костную ткань, кожу, желудок, кишечник, легкие, сердце и плаценту [8], поэтому сывороточные концентрации OPG могут неточно отражать его уровень в пораженной кости. Стандартные иммуноферментные тест-системы обнаруживают все формы циркулирующих фрагментов OPG [9]. В свою очередь, методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), способны выявлять только гомодимерные формы OPG [10].

Сывороточный уровень OPG и RANKL зависит также от ряда физиологических факторов, таких, как время суток, возраст, пол, менопаузный статус, что влияет на интерпретацию результатов определения данного фактора [11]. Некоторые исследователи показали, что уровень OPG в сыворотке крови увеличивается с возрастом как у женщин, так и у мужчин [12]. Уровень OPG у женщин с остеопорозом выше, чем в контрольной группе (обследованные такого же возраста и пола без остеопороза) [13, 14]. Уровень OPG может быть значительно повышен у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе. В свою очередь, гормональные изменения в течение беременности и лактации приводят к снижению концентрации OPG в сыворотке крови и могут обусловливать ускоренное ремоделирование костной ткани в данных физиологических условиях [15]. При этом какими бы ни были ассоциации между сывороточным OPG и RANKL, изменения их уровня противоположны по характеру [16, 17].

В целом клиническое значение определения OPG и RANKL может быть ограничено методологическими сложностями, в результате чего уровень данных факторов в сыворотке может не отражать таковой в ткани. С другой стороны, определение OPG и RANKL в сыворотке крови может применяться для исследований различных групп патологий, в то время как их значимость для обследования отдельных пациентов еще предстоит исследовать [18].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ RANK/RANKL/OPG

Мутации гена, кодирующего OPG, могут приводить к аномалиям связывания RANKL, в результате чего развиваются заболевания с рядом специфических фенотипических проявлений [19]. Например, ювенильная болезнь Педжета (JPD) – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, проявляющееся в раннем детстве деформациями костной ткани, нарушениями слуха, аномалиями развития зубов разной выраженности. Данная патология может быть следствием инактивирующей мутации в гене, кодирующем OPG – *TNFRSF11B*, локализованном в хромосоме 8q24.2. В результате мутации, наблюдаемой в наиболее тяжелых случаях, аминокислотные остатки цистеина в OPG предположительно взаимодействуют с лигандсвязывающим доменом. При менее тяжелых формах JPD могут присутствовать мутации, связанные с другими аминокислотными остатками, кроме цистеина. В свою очередь, делеции и инсерции 5 экзона данного гена наблюдаются при мягких формах данной патологии [20].

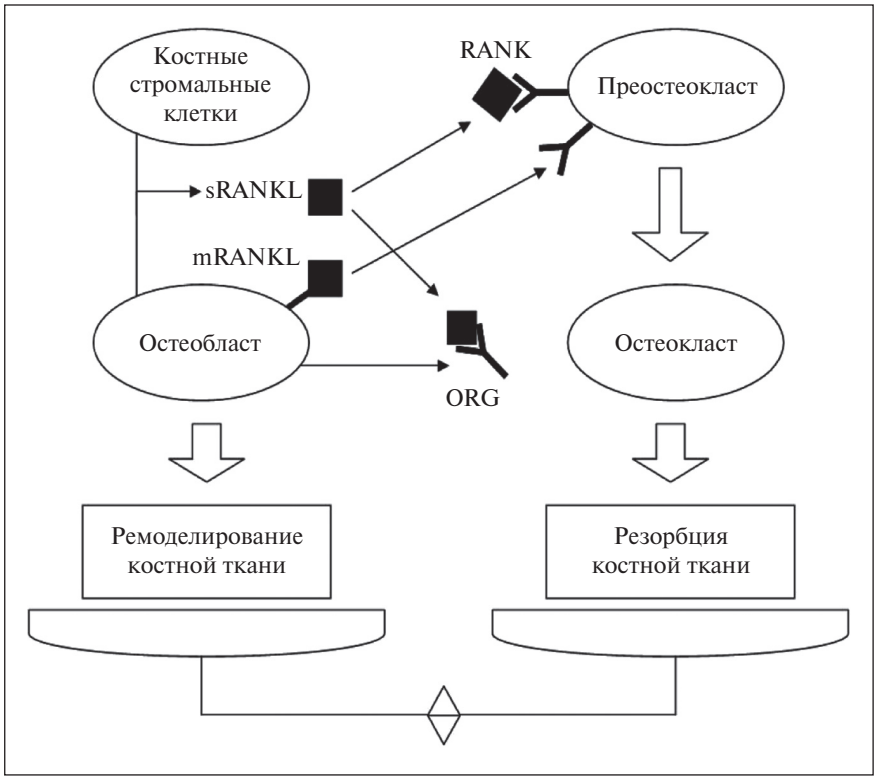


Рис. 1. *Схема действия системы RANK/RANKL/OPG*

RANK кодируется геном *TNFRSF11A*, локализованным в 18 хромосоме. Мутации данного гена могут поражать сигнальный пептидный участок белка RANK, в результате в структуре пептида происходит усиление сигнальной функции данного рецептора [21]. Описываемая активирующая мутация может проявляться в следующих патологических состояниях:

1) ранняя костная болезнь Педжета (PDB2) – гетерогенное аутосомно-доминантное нарушение скелета, которое характеризуется деформацией костей, нарушениями слуха, стоматологическими проблемами. Скелетные проявления могут манифестировать в возрасте до 10 лет и прогрессировать в течение всей жизни. Генетическая природа этой патологии заключается в наличии тандемной дупликации 27-bp в гене *TNFRSF11A*;

2) экспансильная (расширяющаяся) скелетная гиперфосфатемия – аутосомно-доминантное нарушение, проявляющееся ранними дефектами развития зубов, болью в костях в результате ускоренного обновления костной ткани, а также эпизодической гиперкальциемией [22]. Скелетные симптомы начинаются в пубертатном периоде и прогрессируют до среднего возраста. Генетическая причина данного состояния заключается в наличии тандемной дупликации 15-bp в гене *TNFRSF11A*, кодирующем RANK [23];

3) семейный экспансильный остеолиз – аутосомно-доминантное заболевание, которое проявляется с раннего детства до раннего зрелого возраста нарушениями слуха. Остеопения и аномалии зубов наблюдаются при данной патологии реже. Генетической причиной данной аномалии является активирующая мутация, заключающаяся в тандемной дупликации 18-bp в гене, кодирующем RANK [24].

Генетические нарушения в системе RANK/RANKL/OPG отображены в табл. 1.

КЛИНИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ИЗМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ RANK/RANKL/OPG

Существует ряд состояний, при которых данная система играет значительную роль в патогенезе. Первое из таких состояний – **постменопаузальный остеопороз**. В экспериментах *in vitro* на клеточных линиях человеческих остеобластов получено зависимое от дозы и времени воздействия увеличение мРНК OPG в ответ на введение 17β-эстрадиола [25]. Показано, что применение OPG способно предотвращать потерю костной массы у крыс с удаленными яичниками [26]. Кроме того, повышенная экспрессия RANKL выявлена в костной ткани женщин в постменопаузе, не получавших заместительную терапию (в сравнении с таковой при проведении терапии эстрогенами) [27].

Критическая роль системы RANK/RANKL/OPG при **глюкокортикоидиндуцированном остеопорозе** показана в клинических исследованиях у пациентов с болезнью Крона и гломерулонефритом, леченных глюкокортикоидами. Соотношение RANK/OPG в сыворотке крови у них было достоверно повышено, и эти изменения коррелировали с повышением уровня сывороточных маркеров костной резорбции и соответствующих маркеров в моче [28, 29].

Дисбаланс системы RANK/RANKL/OPG может быть вовлечен и в процессы кальцификации при атеросклерозе [30]. У мышей с отключенным геном OPG выявлены накопления кальция в аорте и почечных артериях. С другой стороны, повышенная экспрессия RANK и RANKL обнаружена в кальцифицированных артериях на моделях млекопитающих. Согласно некоторым авторам [31], возрастание сывороточной концентрации OPG в старшем возрасте может являться адаптивным механизмом, с помощью которого осуществляется контроль кальцифицикации сосудов.

Система RANK/RANKL/OPG также вовлечена в развитие ревматоидного артрита. Показано [32], что

Таблица 1

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С СИСТЕМОЙ RANK/RANKL/OPG

Заболевание	Генетическая природа	Клинические проявления
Ювенильная болезнь Педжета (JPD)	Аутосомно-рецессивный тип наследования. Хромосома 8q24.2. Делеция в гене *TNFRSF11B*	Нарушения слуха, остеопения длинных костей, нарушения крупной моторики, деформация костей, гиперкальциурия
Ранняя костная болезнь Педжета (PDB2)	Аутосомно-доминантный тип наследования. Хромосома 18q21-22. Инсерционная мутация 27-bp в *TNFRSF11A*	Аномалии развития зубов, нарушения слуха в раннем возрасте, боль и деформации в области таза, гиперкальциемия
Экспансильная скелетная гиперфосфатемия	Аутосомно-доминантный. Хромосома 18q21-22. Инсерционная мутация 15-bp в *TNFRSF11A*	Ранняя глухота, ранняя потеря зубов, деформации лица, генерализованные боли в скелете, деформации пальцев, эпизодическая гиперкальциемия
Экспансильный семейный остеолиз	Аутосомно-доминантный. Хромосома 18q21-22. Инсерционная мутация 18-bp в *TNFRSF11A*	Глухота в детстве, дефекты зубов, боль в области костей, деформации

в синовиальной жидкости пациентов с этим заболеванием Т-лимфоциты способны экспрессировать RANKL в местах резорбции костей. Повышенный уровень растворимого лиганда sRANKL и OPG выявлен и в сыворотке крови больных ревматоидным артритом, при этом он нормализовался после проведения анти-ФНО-терапии [33].

РОЛЬ СИСТЕМЫ RANK/RANKL/OPG В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И МЕХАНИЗМАХ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Нарушения баланса костного ремоделирования и формирования остеокластов лежат в основе патологических процессов, ассоциированных с опухолевым ростом, таких, как разрушение костей, развитие метастазов, прогрессирование опухоли и т.д. Сигналы, нарушающие баланс RANKL/OPG, могут быть крайне разнообразными и зависеть от типа опухоли, поражающей кость, а также от индивидуальных особенностей конкретной опухоли [34]. При этом все многообразие сигналов в итоге приводит к усилению остеокластогенеза и разрушению костной ткани в результате активности RANKL-сигнального пути. Различные цитокины и молекулярные факторы, такие, как ИЛ1β, 6, 8, 11, 17, макрофагальный воспалительный протеин 1α, ФНОα, PTHrP, простагландин Е, способны усиливать продукцию RANKL стромальными клетками костного микроокружения, включая клетки остеобластов. В свою очередь, продукция опухолью рецептора OPG, выполняющего функцию ловушки для RANKL, может быть понижена путем уменьшения синтеза данного рецептора или активации его деградации [35].

Некоторые факторы при метастатическом поражении костей могут оказывать двойной эффект на соотношение RANKL/OPG. PTHrP, ИЛ1, простагландин E_2 способны стимулировать активность остеокластов в костной строме как путем усиления действия RANKL, так и за счет снижения уровня OPG. Источником RANKL при костных метастазах могут также служить Т-лимфоциты [36, 37]. Например, клетки множественной миеломы могут индуцировать усиление продукции RANKL Т-лимфоцитами [38]. Однако немногочисленные доказательства влияния Т-лимфоцитов на развитие метастатического поражения костей получены только на предклинических моделях. Увеличение содержания RANKL, которое ведет к опухольиндуцируемому остеокластогенезу, не лимитируется клетками иммунной системы.

Экспрессия RANKL обнаружена при раке молочной железы (РМЖ), раке предстательной железы (РПЖ), почки и множественной миеломе. Продуцируемый опухолевыми клетками RANKL способен усиливать процессы остеокластогенеза *in vitro* [39], что позволяет предположить возможность прямого влияния опухолевых клеток, локализованных в костной ткани, на остеокластогенез. Повышение уровня RANKL наблюдали в клеточных линиях опухоли предстательной железы, обработанных TGF-β [40]. Связь между высокой экспрессией RANKL при первичных опухолях и уровнем метастазирования описана для пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [41]. Высокое соотношение RANKL/OPG в сыворотке крови у пациентов с множественной миеломой соответствовало более значительному метастатическому поражению костей, что может говорить как о повышенной продукции RANKL клетками опухоли, так и о системной природе данного заболевания [42].

Изучение функциональных связей RANKL и опухольиндуцированных поражений костей проводили в экспериментальных исследованиях на крысах с помощью ингибиторов RANKL – таких, как OPG и RANK-Fc. Ингибирование RANKL было изучено на моделях различных типов опухолей (множественная миелома, РМЖ, РПЖ, рак легких, ободочной кишки и т.д.); практически во всех случаях было отмечено уменьшение очагов опухольиндуцированного поражения костей. Блокада RANKL также снижала выраженность других связанных с опухолью состояний, таких, как боль в костях [43] и гиперкальциемия [44]. Ингибирование RANKL у животных с костными метастазами приводило к уменьшению опухольассоциированного воспаления, снижению пролиферации опухолевых клеток, усилению апоптоза, а также увеличению сроков выживаемости [45 ,46].

В эксперименте на животных также довольно хорошо изучена роль RANKL в развитии отдаленных метастазов, причем не только костных. Так, ингибирование RANKL посредством RANK-Fc приводило к снижению частоты образования спонтанных метастазов в легкие у трансгенных мышей MMTV-neu [47]. Снижение метастазирования в кости и легких описано у животных с RANK-позитивной меланомой. Описан также и противоположный эффект; он наблюдался у мышей с повышенным уровнем RANKL и трансплантированными опухолевыми клетками (RANKL-позитивный человеческий РМЖ, полученный от мышей MMTV-neu) [48].

Анализ экспрессии RANK и воздействие с помощью RANKL на клетки *in vitro* показали наличие функциональной экспрессии этого рецептора на поверхности клеток РПЖ, РМЖ, меланомы, а также остеосаркомы. В большинстве подобных исследований RANKL не увеличивал пролиферативную активность RANK-экспрессирующих клеток [49], однако при РМЖ наблюдали увеличение количества клеток в результате защиты от индуцированной повреждением ДНК (в результате химиотерапии или γ-излучения) клеточной смерти [50].

Взаимосвязь системы RANK/RANKL/OPG с другими клеточными системами отображена на рис. 2.

Примечательно, что воздействие RANKL на некоторые клеточные линии приводит к активации факторов, ответственных за миграцию, инвазию и

метастазирование. Так, воздействие RANKL на вызванные РМЖ остеолитические поражения приводило к индукции таких факторов, как матриксные металлопротеиназы 1 и 9; фактор, индуцирующий матриксные металлопротеиназы EMMPRIN/CD47; ICAM-1, ИЛ6, ИЛ8, а также фактор роста эндотелия – VEGF [51]. В свою очередь, воздействие RANKL на клетки костных метастазов РПЖ способствовало снижению экспрессии супрессора метастазов serpin 5b/maspin [52].

RANKL-зависимое усиление миграции и инвазии опухолевых клеток, наблюдавшееся в описанных выше экспериментах, может приводить и к развитию отдаленных метастазов *in vivo*. В то же время усиление экспрессии RANK линиями опухолевых клеток не является обязательным условием для их метастазирования в кости у экспериментальных животных. Точные механизмы, при которых уменьшаются показатели метастазирования при ингибировании RANKL, до сих пор изучены недостаточно.

Целенаправленное воздействие на RANKL для ингибирования опухольиндуцированных остеокластов на предклинических моделях открывает некоторые возможности для лечения скелетных осложнений злокачественных опухолей, включая метастазирование в кости. Для выяснения действия ингибиторов остеокластов полезна оценка фармакодинамики маркеров костной резорбции, таких, как N-телопептид коллагена I типа (NTX), повышенный уровень которого ассоциируется с более значительным риском метастазирования в кости и более высокой смертностью пациентов [53].

Одним из первых антагонистов RANKL является рекомбинантный OPG (Fc-OPG, Amgen). Впервые эффект этого ингибитора RANKL продемонстрирован у пациентов с множественной миеломой и РМЖ, осложненными поражением костей. В ходе лечения отмечали снижение уровня биомаркеров резорбции (включая uNTX/Cr), однако дальнейшее клиническое использование Fc-OPG не получило развития из-за сравнительно короткого периода полураспада препарата, а также возможного риска активации иммунного ответа на эндогенный OPG [54]. Был разработан другой препарат OPG – CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование I фазы не увенчалось успехом [55].

Антитела к RANKL – ALX-0141 (Ablynx) были протестированы в клиническом исследовании I фазы у здоровых женщин в постменопаузе [56], а полностью человеческие антитела к RANKL – Denosumab (AMG 162), обладающие высокой селективностью к человеческому RANKL, в ходе клинического исследования I фазы приводили к снижению маркеров костной резорбции (uNTX/Cr), а также не вызвали серьезных побочных эффектов. Исследования II фазы препарата Denosumab показали его эффективность и безопасность у больных РМЖ, осложненным поражением костей, а также при костных метастазах РПЖ и множественной миеломе [57].

В ряде исследований для лечения пациентов с метастатическим поражением костей при РМЖ [58], РПЖ [59], множественной миеломе [60] применяли золедроновую кислоту (ZA), сравнивая ее с препаратом Denosumab. Во всех 3 исследованиях выживаемость пациентов в группах, получавших Denosumab и ZA, оказалась практически одинаковой. Почти не различался также уровень побочных эффектов, однако проявления, потенциально связанные с нефротоксичностью, чаще встречались у больных, получавших ZA, а при применении Denosumab чаще наблюдалась гипокальциемия.

СИСТЕМА RANK/RANKL/OPG ПРИ ПЕРВИЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ КОСТЕЙ

Первичные и вторичные опухоли костей – крайне серьезная и трудная в диагностике и лечении группа новообразований, патогенез которых связан с уникальными особенностями костной ткани и параметрами костной микросреды. Система RANK/RANKL/OPG как ключевой регулятор костного ремоделирования открывает новую эру в изучении опухолей костей.

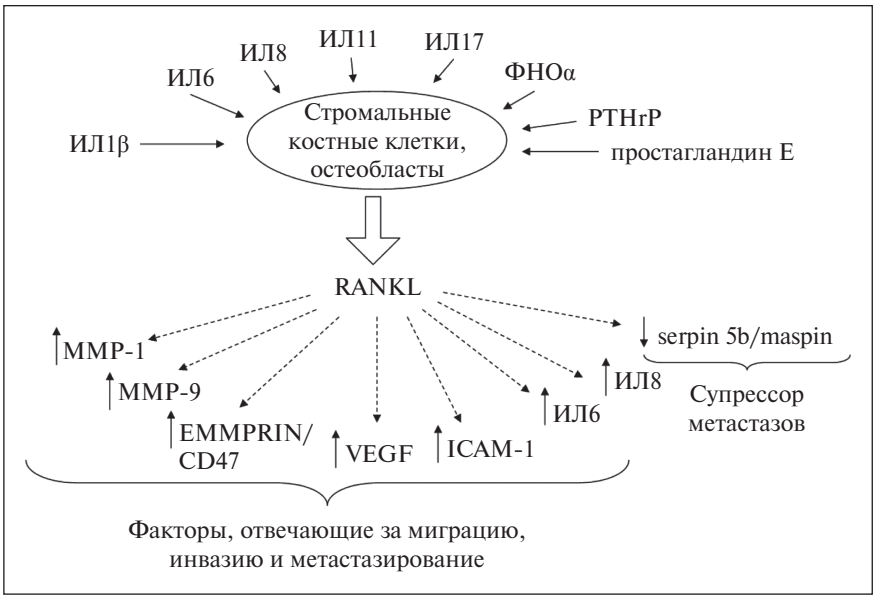


Рис. 2. *Взаимосвязь системы RANK/RANKL/OPG с другими молекулярными факторами*

Остеосаркома – одна из самых распространенных злокачественных опухолей костей, поражающая людей молодого возраста и характеризующаяся крайне неблагоприятным прогнозом. Роль системы RANK при остеосаркоме изучена недостаточно, однако влияние клеток последней на функцию остеокластов позволяет предположить тесную связь между агрессивностью остеосаркомы и активностью остеокластов.

В культуре клеток остеосаркомы MG63 выявлена высокая экспрессия факторов, отвечающих за остеокластогенез – M-CSF и RANKL. Примечательно, что клетки линии MG63 продемонстрировали способность паракринно индуцировать остеокластогенную активность. Понимание механизмов, лежащих в основе данного явления, может быть раскрыто в процессе изучения системы RANK/RANKL/OPG [61].

На мышиных моделях показано влияние OPG на развитие остеосаркомы. Введение OPG способствовало снижению роста опухоли и ассоциированного с опухолью воспаления, причем опухолевые клетки, использованные в данных экспериментах, экспрессировали RANKL [62]. Впоследствии те же авторы проанализировали профиль экспрессии мРНК и белков в клетках остеогенной саркомы человека *in vitro* с использованием полученных *ex vivo* патологических тканей для оценки функциональной активности молекулярных путей, модулируемых RANKL. С помощью реакции ОТ-ПЦР, а также иммуногистохимического окрашивания была показана экспрессия RANK в линиях человеческой остеосаркомы MNNG/HOS, Saos-2 и MG-63, однако в клетках остеосаркомы линии U-2 она отсутствовала. При анализе биоптатов больных остеосаркомой обнаружена также экспрессия RANK. Проведенный затем иммуноблоттинг показал значительную функциональную активность RANK, выражавшуюся в индукции в клетках остеосаркомы под действием RANKL фосфорилирования таких внутриклеточных сигнальных белков, как ERK1/2, p38, IκB. Подобные изменения выявлены в RANK-позитивных клетках остеосаркомы и являются свидетельством вовлеченности системы RANK/RANK/OPG в патогенез первичных новообразований костей [63].

Целенаправленное воздействие на данную систему изучали на моделях млекопитающих [64], используя в качестве ингибитора RANKL малые интерферирущие РНК (Rkl-siRNA), которые тестировали на моделях остеосаркомы на иммуннокомпетентных и бестимусных мышах. Внутриопухолевое введение siRNA в комбинации с катионной липосомой RPR209120/DOPE обусловливало локальное и системное снижение продукции RANKL и защиту костной ткани от ассоциированного с опухолью остеолиза. В то же время отдельное введение siRNA не оказывало значимого эффекта на развитие опухоли в изучаемых моделях. Однако при использовании комбинации siRNA с ифосфамидом наблюдалось значимое снижение прогрессирования опухоли по сравнению с ситуацией при изолированном введении ифосфамида. Таким образом, siRNA, доставляемые посредством катионных липосом, способны ингибировать продукцию RANKL на экспериментальных моделях остеосаркомы [64], однако эти данные нуждаются в основательной клинической проверке.

J. Lee и соавт. изучена связь экспрессии RANKL с эффективностью лечения больных остеосаркомой высокой степени злокачественности. В исследовании участвовали 40 пациентов с локализованной высокозлокачественной остеосаркомой, у которых были взяты образцы тканей до лечения. У 75% больных наблюдали экспрессию RANKL в опухоли, причем у 50% она достигала высокой степени (≥4). При этом ее уровень не был связан с возрастом и полом пациентов, локализацией опухоли, ее объемом и морфологическим типом, однако выявлена достоверная связь между высоким уровнем экспрессии RANKL и слабым ответом на последующую неоадъювантную химиотерапию. Кроме того, высокий уровень экспрессии RANKL был связан с более низкой 5-летней выживаемостью [65].

Другим новообразованием, при котором изучали роль системы RANK/RANKL/OPG, была саркома Юинга – первичная злокачественная мелкокруглоклеточная опухоль кости, способная вызывать быстрый и интенсивный остеолиз. Клеточные механизмы, лежащие в основе данного явления, до сих пор остаются малоизученными. В исследовании, проведенном R. Taylor и соавт. [66] на культуре клеток саркомы Юинга, показано, что лакунарная резорбция обусловлена не CD99-положительными опухолевыми клетками, а CD68-положительными макрофагами и остеокластоподобными клетками, причем в отсутствие RANKL. Иммуногистохимически и с помощью ОТ-ПЦР показано, что клетки саркомы Юинга способны экспрессировать собственный RANKL, а также макрофагальный колониестимулирующий фактор M-CSF, вырабатывая, таким образом, аутокринно 2 основных остеокластогенных фактора. Эти данные позволяют предположить, что клетки саркомы Юинга не оказывают резорбционного действия на костную ткань напрямую, а усиливают формирование остеокластов посредством активации системы RANKL.

Экспрессия RANKL и RANK в тканях человеческой хондросаркомы выше, чем в неизмененной хрящевой ткани. На культуре клеток хондросаркомы JJ012 получены данные, согласно которым RANKL отвечает за миграцию клеток хондросаркомы, а также за повышение экспрессии β1-интегрина на клеточной поверхности. В свою очередь введение ингибиторов MAP-киназы (MEK) – PD98059 или U012 – приводило к ингибированию RANKL-опосредованной миграции. Стимуляция клеток хондросаркомы с помощью RANKL обусловливала усиление фос-

форилирования ключевых молекул клеточных сигнальных путей – MEK и ERK. На основании этого можно предполагать, что в клетках хондросаркомы RANKL действует через MAP-киназный сигнальный путь, который в свою очередь активирует IKKα/β и NFκB. Происходящая в результате этого активация β1-интегрина в конечном счете и усиливает миграцию клеток хондросаркомы [67]. Повышенную экспрессию RANKL, OPG и RANK также наблюдали в многоядерных гигантских клетках аневризмальной костной кисты [68].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система RANK/RANKL/OPG – важное звено ряда патологических процессов, в том числе и онкологических заболеваний, сопровождающихся поражением костной ткани. Изучение роли данной системы при первичных новообразованиях костей остается актуальной задачей для исследования на клиническом материале, а также открывает перспективы для разработки новых методов диагностики и молекулярно-направленного химиотерапевтического лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. ASBMR Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral and metabolism. 6th ed. Washington D.C.: American Society for Bone and Mineral Research. – 2008; 537.
2. Suda T., Takahashi N., Martin T. Modulation of osteoclast differentiation // Endocr. Rev. – 1992; 13: 66–80.
3. Dougall W. Molecular Pathways: Osteoclast-Dependent and Osteoclast-Independent Roles of the RANKL/RANK/OPG Pathway in Tumorigenesis and Metastasis // Clin. Cancer Res. – 2012; 18: 326–35.
4. Kang Y., Siegel P., Shu W. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone // Cancer Cell. – 2003; 3: 537–49.
5. Manolagas S. Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling // BoneKey-Osteovision. – 2006; 3: 5–14.
6. Blair J., Zheng Y., Dunstan C. RANK ligand // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2007; 39: 1077–81.
7. Hsu H., Lacey D., Dunstan C. et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999; 96: 3540–45.
8. Simonet W., Lacey D., Dunstan C. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density // Cell. – 1997; 89: 309–19.
9. Hannon R., Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover // Osteoporos. Int. – 2001; 1 (Suppl. 6): 30–40.
10. Furuya D., Kaneko R., Yagihashi A. et al. Immuno-PCR assay for homodimericosteoprotegerin // Clin. Chem. – 2001; 47: 1475–77.
11. Hawa G., Brinskelle-Schmal N., Glatz K. et al. Immunoassay for soluble RANKL (receptor activator of NF-B ligand) in serum // Clin. Lab. – 2003; 49: 461–63.
12. Kudlacek S., Schneider B., Woloszczuk W. et al. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population // Bone. – 2003; 32: 681–86.
13. Grigorie D., Neacsu E., Marinescu M., Popa O. Circulating osteoprotegerin and leptin levels in postmenopausal women with and without osteoporosis // Rom. J. Intern. Med. – 2003; 41: 409–15.
14. Riggs B., Khosla S., Atkinson E. et al. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency // Osteoporos. Int. – 2003; 14: 728–33.
15. Uemura H., Yasui T., Kiyokawa M. et al. Serum osteoprotegerin/osteoclastogenesis- inhibitory factor during pregnancy and lactation and the relationship with calcium-regulating hormones and bone turnover markers // J. Endocrinol. – 2002; 174: 353–59.
16. Jorgensen H., Kusk P., Madsen B. et al. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios // J. Bone Miner. Metab. – 2004; 22: 132–38.
17. Schett G., Kiechl S., Redlich K. et al. Soluble RANKL and risk of nontraumatic fracture // JAMA. – 2004; 291: 1108–13.
18. Vega D., Maalouf N., Sakhaee K. The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor-B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2007; 92 (12): 4514–21.
19. McKusick V. Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B; TNFRSF11B. In: Online Mendelian inheritance in man. Baltimore, MD: Johns Hopkins University, 2007.
20. Whyte M., Obrecht S., Finnegan P. et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease // N. Engl. J. Med. – 2002; 347: 175–84.
21. Hughes A., Ralston S., Marken J. et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansileosteolysis // Nat. Genet. – 2000; 24: 45–8.
22. Whyte M., Mills B., Reinus W. et al. Expansile skeletal hyperphosphatasia: a new familial metabolic bone disease // J. Bone Miner. Res. – 2000; 15: 2330–44.
23. Whyte M., Hughes A. Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF11A encoding RANK and isallelic to familial expansileosteolysis // J. Bone Miner. Res. – 2002; 17: 26–9.
24. Whyte M., Reinus W., Podgornik M., Mills B. Familial expansileosteolysis (excessive RANK effect) in a 5-generation American kindred // Medicine. – 2002; 81: 101–21.
25. Jilka R. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update // Bone. – 1998; 23: 75–81.
26. Hofbauer L., Khosla S., Dunstan C. et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells // Endocrinology. – 1999; 140: 4367–70.
27. Eghbali-Fatourechi G., Khosla S., Sanyal A. et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women // J. Clin. Invest. – 2003; 111: 1221–30.
28. von Tirpitz C., Epp S., Klaus J. et al. Effect of systemic glucocorticoid therapy on bone metabolism and the osteoprotegerin system in patients with active Crohn's disease // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2003; 15: 1165–70.
29. Sasaki N., Kusano E., Ando Y. et al. Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis // Bone. – 2002; 30: 853–58.
30. Pennisi P., Signorelli S., Riccobene S. et al. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels // Osteoporos. Int. – 2004; 15: 389–95.
31. Min H., Morony S., Sarosi I. et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis // J. Exp. Med. – 2000; 192: 463–74.
32. Shigeyama Y., Pap T., Kunzler P. et al. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 2000; 43: 2523–30.
33. Ziolkowska M., Kurowska M., Radzikowska A. et al. High levels of osteoprotegerinand soluble receptor activator of nuclear factoB ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after antitumor necrosis factor treatment // Arthritis Rheum. – 2002; 46: 1744–53.
34. Mundy G. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities // Nat. Rev. Cancer. – 2002; 2: 584–93.
35. Roodman G., Dougall W. RANK ligand as a therapeutic target for bone metastases and multiple myeloma // Cancer Treat. Rev. – 2008; 34: 92–101.
36. Anderson D., Maraskovsky E., Billingsley W. et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function // Nature. – 1997; 390: 175–9.
37. Totsuka T., Kanai T., Nemoto Y. et al. RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function ofCD4+CD25+regulatory T cells in chronic colitis // J. Immunol. – 2009; 182: P. 6079–87.
38. Giuliani N., Colla S., Sala R. et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease // Blood. – 2002; 100: 4615–21.
39. Zhang Y., Heulsmann A., Tondravi M. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways // J. Biol. Chem. – 2001; 276: 563–8.

40. Zhang J., Lu Y., Dai J. et al. *In vivo* realtime imaging of TGF-beta-induced transcriptional activation of the RANK ligand gene promoter in intraosseous prostate cancer // Prostate. – 2004; 59: 360–9.

41. Sasaki A., Ishikawa K., Haraguchi N. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) expression in hepatocellular carcinoma with bone metastasis // Ann. Surg. Oncol. – 2007; 14: 1191–9.

42. Terpos E., Szydlo R., Apperley J. et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaBligandosteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index // Blood. – 2003; 102: 1064–9.

43. Honore P., Luger N., Sabino M. et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord // Nat. Med. – 2000; 6: 521–8.

44. Capparelli C., Kostenuik P., Morony S. et al. Osteoprotegerin prevents and reverses hypercalcemia in a murine model of humoralhypercalcemia of malignancy // Cancer Res. – 2000; 60: 783–7.

45. Miller R., Roudier M., Jones J. et al. RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis // Mol. Cancer Ther. – 2008; 7: 2160–9.

46. Zheng Y., Zhou H., Brennan K. et al. Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis // Bone. – 2007; 40: 471–8.

47. Tan W., Zhang W., Strasner A. et al. Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling // Nature. – 2011; 470: 548–53.

48. Jones D., Nakashima T., Sanchez O. et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL // Nature. – 2006; 440: 692–6.

49. Armstrong A., Miller R., Jones J. et al. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes // Prostate. – 2008; 68: 92–104.

50. Schramek D., Leibbrandt A., Sigl V. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin- driven mammary cancer // Nature. – 2010; 468: 98–102.

51. Rucci N., Millimaggi D., Mari M. et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancerinducedosteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 // Cancer Res. – 2010; 70: 6150–60.

52. Luo J., Tan W., Ricono J. et al. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin // Nature. – 2007; 446: 690–4.

53. Coleman R., 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.

54. Body J., Greipp P., Coleman R. et al. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases // Cancer. – 2003; 97: 887–92.

55. Clinical Trials. Gov. Bethesda (MD): NIH. Single ascending-dose study to characterize the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of CEP-37251 in healthy postmenopausal women 2010 // Available from: http://clinicaltrials.gov/show/NCT01159873.

56. van de Wetering de Rooij J., Lyssens C., ten Holder S. et al. Safety, pharmacokinetics and efficacy of anti-RANKL nanobody ALX-0141 in healthy postmenopausal women // Ann. Rheum. Dis. – 2011; 70 (3): 136.

57. Fizazi K., Lipton A., Mariette X. et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates // J. Clin. Oncol. – 2009; 27: 1564–71.

58. Stopeck A., Lipton A., Body J. et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study // J. Clin. Oncol. – 2010; 28: 5132–9.

59. Fizazi K., Carducci M., Smith M. et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study // Lancet. – 2011; 377: 813–22.

60. Henry D., Costa L., Goldwasser F. et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma // J. Clin. Oncol. – 2011; 29: 1125–32.

61. Costa-Rodrigues J., Teixeira C., Fernandes M. Paracrine-mediated osteoclastogenesis by the osteosarcoma MG63 cell line: is RANKL/RANK signalling really important? // Clin. Exp. Metastasis. – 2011; 28 (6): 505–14.

62. Mori K., Ando K., Heymann D., Rédini F. Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) stimulates bone-associated tumors through functional RANK expressed on bone-associated cancer cells? // Histol. Histopathol. – 2009; 24 (2): 235–42.

63. Mori K., Le Goff B., Berreur M. et al. Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B // J. Pathol. – 2007; 211 (5): 555–62.

64. Rousseau J., Escriou V., Lamoureux F. et al. Formulated siRNAs targeting Rankl prevent osteolysis and enhance chemotherapeutic response in osteosarcoma models // J. Bone Miner. Res. – 2011; 26 (10): 2452–62.

65. Lee J., Jung J., Kim D. et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma // Pediatr. Blood Cancer. – 2011; 56 (5): 738–43.

66. Taylor R., Knowles H., Athanasou N. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis // J. Pathol. – 2011; 225 (2): 195–202.

67. Hsu C., Lin T., Kuo C. et al. Involvement of integrin up-regulation in RANKL/RANK pathway of chondrosarcomas migration // J. Cell.Biochem. – 2010 Sep 1;111 (1): 138–47. doi: 10.1002/jcb.22677.

68. Liu B., Yu S., Li T. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts // J. Oral. Pathol. Med. – 2003; 32 (6): 367–75.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.11-006.6-037-078.33

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ ТКАНЕВЫЕ ИНГИБИТОРЫ В КЛИНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ И ПРОГНОЗЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

Е.С. Герштейн[1], доктор биологических наук, **Д.Н. Кушлинский**[2],
Л.В. Адамян[2], академик РАМН, профессор, **И.В. Терешкина**[1], кандидат медицинских наук,
К.П. Лактионов[1], доктор медицинских наук, профессор

[1]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН,
[2]Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва

E-mail: biochimia@mtu-net.ru

Представлен анализ публикаций, посвященных изучению роли различных представителей семейства матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов в дифференциальной диагностике, прогнозировании клинического течения и разработке новых методов терапии рака яичников. Признано, что наиболее перспективными маркерами для дифференциальной диагностики и прогноза рака яичников можно считать желатиназы/коллагеназы коллагена IV – ММП-9 и ММП-2, матрилизин (ММП-7), а также тканевый ингибитор ММП 1 типа (ТИМП-1) и мембраноассоциированную ММП-1. Существующие методы подавления активности ММП, в том числе использование специфических ингибиторов, позволяют снизить инвазивность клеток рака яичников in vitro, но требуют дальнейшей доработки и усовершенствования для внедрения в клинику.

Ключевые слова: *матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, рак яичников, диагностика, прогноз, молекулярно-направленная терапия*

MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR TISSUE INHIBITORS IN OVARIAN CANCER CLINICAL COURSE AND PROGNOSIS

E.S. Gershtein[1], D.N. Kushlinsky[2], L.V. Adamyan[2], I.V. Tereshkina[1], K.P. Laktionov[1]
[1]N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow
[2]Academician V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Moscow

Publications devoted to the role of various representatives of matrix metalloproteinases (MMPs) family and their tissue inhibitors in ovarian cancer in differential diagnostics, prognosis and in the development of new treatment modalities are critically analyzed in this review. It is concluded that gelatinases/collagen IV collagenases – MMP-9 and MMP-2, matrilysin (MMP-7), type 1 tissue MMP inhibitor (TIMP-1) and membrane-type MMP-1 can be considered as the most perspective markers for differential diagnostics and ovarian cancer prognosis. Existing methods of suppression of MMPs activity including application of specific inhibitors permit to reduce ovarian cancer cells invasiveness in vitro, but need further refinement for introduction into clinical practice.

Key words: *matrix metalloproteinases, tissue matrix metalloproteinase inhibitors, ovarian cancer, diagnostics, prognosis, molecular targeted therapy*

Способность к инвазии окружающих тканей и метастазированию в отдаленные органы – одно из фундаментальных свойств злокачественных опухолей. На всех этапах инвазии и метастазирования опухолевая клетка находится в тесном контакте с внеклеточном матриксом (ВКМ), поэтому одним из главных молекулярных механизмов, лежащих в основе этих процессов, считается разрушение окружающей базальной мембраны и ВКМ ассоциированными с опухолью протеазами. Последние участвуют также в опухолевом ангиогенезе, способствуя распространению новых капиллярных сосудов.

Деградация ВКМ – неотъемлемая часть не только опухолевой прогрессии, но и многих физиологических процессов, например, развития, роста и регенерации ткани. Но в процессе канцерогенеза регуляторные пути, влияющие на деградацию ВКМ, как правило, нарушаются и происходит патологическая экспрессия регуляторных белков, что помогает опухолевой клетке пройти все этапы метастазирования.

Известно, что во все этапы прогрессирования опухолевого процесса вовлечены матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство, состоящее из более чем 20 секретируемых или связанных с поверхностью клетки цинкзависимых эндопептидаз, способных к деградации практически всех компонентов ВКМ [1]. В зависимости от структурно-функциональных особенностей и субстратной специфичности ММП делят на несколько подсемейств. Основными подсемействами ММП являются коллагеназы широкого

спектра действия (например, ММП-1, 8, 13), желатиназы/специфические коллагеназы коллагена IV типа (ММП-2 и 9), стромелизины (например, ММП-3 и 10), матрилизины (ММП-7, ММП-26), и ММП мембранного типа [2, 3].

Активация ММП в межклеточном пространстве специфически подавляется эндогенными тканевыми ингибиторами (ТИМП), которые соединяются с цинксвязывающими участками активных ММП в эквимолярном соотношении. ТИМП образуют прочные комплексы как с активными формами ММП, так и с их секретируемыми проферментами, регулируя посредством этого их активность [4]. Семейство ТИМП состоит из 4 структурно родственных белков, 3 из которых (ТИМП-1, 2 и 4) секретируются в растворимой форме, а 1 (ТИМП-3) связан с ВКМ. ТИМП индуцируют изменения морфологии клетки, стимулируют рост некоторых типов клеток, участвуют в стероидогенезе и развитии герминогенных клеток обоих полов. По своей структуре ТИМП высоко специфичны к активному связывающему участку ММП (по принципу ключ-замок) и ингибируют весь спектр ММП.

Роль ММП в прогрессии и метастазировании опухолей впервые определена L. Liotta и соавт. в начале 1980-х годов [5], когда был обнаружен протеолиз коллагена IV типа в процессе инвазии и метастазирования меланомы кожи и стало ясно, что он обусловлен главным образом протеолитической активностью ММП-2 и(или) ММП-9. Первоначально предполагалось, что опухолевые клетки самостоятельно вырабатывают ММП, а стромальные – индуцируют секрецию ММП опухолями. Позднее была сформулирована концепция, согласно которой стромальные клетки сами могут экспрессировать ММП. Анализ методом гибридизациеи *in situ* показал, что стромальные клетки экспрессируют ММП даже чаще, чем опухолевые [6, 7]. Выделение многих ММП клетками соединительной ткани, включая фибробласты и воспалительные клетки, является ответной реакцией на возникновение опухоли. Однако есть исключения, например: матрилизин (ММП-7), как правило, экспрессируется эпителиальными клетками опухоли; в случае ММП-2 известно, что ее мРНК продуцируется преимущественно стромальными клетками, но сам фермент секретируется и активируется на границе опухолевой и неизмененной ткани [8].

Все члены семейства ММП способны гидролизовать основные белковые компоненты ВКМ, включая протеогликаны, ламинин, фибронектин, желатин, коллаген, энтактин, тенаскин, витронектин и др. Кроме того, функцией ММП может быть активация других металлопротеиназ, усиливающая процесс деградации внеклеточного матрикса, в результате чего опухолевая клетка может свободно мигрировать в строму и дальше – в кровеносное русло с последующей экстравазацией, основывая новый метастатический очаг. Опухолевая клетка находится в тесном контакте с внеклеточным матриксом на всех этапах инвазии и метастазирования. Регуляторные пути, влияющие на процессы деградации ВКМ, в процессе канцерогенеза, как правило, нарушаются; может также отмечаться патологическая экспрессия регуляторных белков, что помогает опухолевой клетке пройти все этапы метастазирования.

В экспериментальных исследованиях доказана корреляционная взаимосвязь повышения экспрессии ММП опухолевыми и(или) стромальными клетками с прогрессией, метастазированием и ангиогенезом [9, 10]. В ряде ретроспективных клинических исследований отмечена повышенная экспрессия различных ММП в первичном опухолевом очаге и(или) метастазах, ассоциированная со степенью дифференцировки опухоли, глубиной инвазии, развитием отдаленных метастазов, а также с плохим прогнозом и низкой выживаемостью пациентов с различными злокачественными новообразованиями [3, 8, 11]. Продемонстрировано, что повышение уровня ММП в сыворотке (плазме крови) онкологических больных коррелирует с метастатическим процессом и может рассматриваться как фактор плохого прогноза [12–14]. В то же время известно, что растворимые ММП в периферической крови находятся в основном в форме профермента или в комплексе с природными ингибиторами – такими, как ТИМП или α2-макроглобулин [15], поэтому повышенная экспрессия ММП часто сопровождается увеличением экспрессии соответствующих ТИМП [16], а функциональное значение циркулирующих в периферической крови ММП в прогрессии опухоли до конца не ясно.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ММП И ТИМП ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ

Рак яичников – одна из наиболее инвазивных злокачественных опухолей, причем в большинстве случаев заболевание диагностируется на поздних стадиях, когда опухоль уже распространена по брюшине. Трудности ранней диагностики и высокий метастатический и инвазивный потенциал определяют необходимость углубленного изучения механизмов распространения рака яичников, знание которых могло бы стать основой для создания новых препаратов, целенаправленно воздействующих на процессы метастазирования и инвазии. В этой связи исследование ММП при раке яичников – одно из наиболее клинически перспективных направлений в области изучения роли этой протеолитической системы при различных опухолях человека.

Желатиназы/IV коллагеназы: ММП-2 (72-kDa коллагеназа коллагена IV типа, желатиназа A) и ММП-9 (92-kDa коллагеназа коллагена IV типа, желатиназа B) наиболее известны как протеазы, ги-

дролизующие коллаген IV типа – основной компонент базальной мембраны эпителиальных опухолей, т.е. специфические коллагеназы, но они также разрушают другие существенные компоненты ВКМ и обладают желатинолитической (желатиназной) активностью.

Регуляция активности коллагеназ – сложный и до конца не изученный процесс, важнейшую роль в котором играют ТИМП. В экспериментальных исследованиях продемонстрирована важная роль ММП-2 и ММП-9 в формировании инвазивного потенциала клеток рака яичников [17, 18], причем индукция ММП служит одним из ключевых механизмов проявления проинвазивных эффектов эпидермального [19, 20], и β-трансформирующего факторов роста [21–23]. Показано также, что эти протеазы находятся в комплексном взаимодействии с ключевым активатором ангиогенеза – фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor – VEGF): с одной стороны, коллагеназы индуцируют секрецию VEGF опухолевыми клетками, что способствует образованию асцита [24–26], с другой – секретируемый опухолью VEGF регулирует экспрессию коллагеназ в строме, влияя на инвазивную способность опухоли [27, 28]. Активность ММП-2 и ММП-9 в культивируемых клетках рака яичников увеличивается и под действием гормонов стресса (катехоламинов), при этом в 2–3 раза возрастает инвазивность опухолевых клеток в тестах *in vitro* [29–31].

Следует отметить, что система ММП/ТИМП, и в первую очередь коллагеназы, играет ключевую роль в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса, связанных с развитием фолликула в неизмененных яичниках [32]. ММП-2 и ММП-9, а также ТИМП-1, 2 и 3 локализуются в оболочке развивающихся фолликулов и в строме яичников, именно вокруг фолликулов выявляется наибольшая желатинолитическая активность коллагеназ. Качественные характеристики созревающего фолликула во многом зависят от уровня и соотношения компонентов ММП/ТИМП системы. Желатинолитическая активность проявляется и во время образования желтого тела, а также играет ключевую роль в его регрессии. В лютеинизированных гранулезных клетках женщин с синдромом поликистозных яичников баланс между ММП и их тканевыми ингибиторами сдвинут в сторону увеличения активности ММП. В связи с этим ряд авторов предполагают важное значение активации ММП-2 и ММП-9 в нарушении атрезии фолликулов при этом заболевании [33–35].

В наиболее ранних клинико-лабораторных исследованиях, посвященных роли коллагеназ при раке и других новообразованиях яичников, изучали экспрессию и активность ММП в опухолях яичников различной злокачественности в сопоставлении с клинико-морфологическими характеристиками. Так, M. Naylor и соавт. [36] оценивали экспрессию нескольких ММП, в том числе ММП-9, в биоптатах рака яичников методами зимографии и гибридизации *in situ*. В большинстве образцов были обнаружены соответствующие мРНК, локализовавшиеся преимущественно в стромальных участках, причем максимальная экспрессия наблюдалась в областях, смежных с областями скопления эпителиальных опухолевых клеток. Зимографически выявлено, что активность ММП-9 в биопсийных образцах рака яичников была значительно выше, чем в опухолях других локализаций, изученных этими авторами ранее, однако в отличие от других опухолей никакой корреляции между активностью ММП-9 и степенью дифференцировки рака яичников не обнаружено.

K. Sakata и соавт. [37] исследовали иммуногистохимически экспрессию ММП-9 и ММП-2, а также ММП мембранного типа 1 (МТ1-ММП), ТИМП-1 и ТИМП-2 в эпителиальных опухолях яичников. Частота выявления всех исследованных белков (за исключением ТИМП-1 в карциномах яичников) была значительно выше, чем в пограничных и доброкачественных опухолях. Напротив, диффузное окрашивание на ТИМП-1 оказалось интенсивнее в доброкачественных и пограничных опухолях, чем при раке яичников. Во всех случаях выявления диффузного окрашивания на ММП-9 отмечено отсутствие экспрессии ТИМП-1. Диффузное окрашивание на ММП-9 было значительно выше в карциномах яичников с метастазами в лимфатические узлы, чем без таких метастазов. Авторы предположили, что повышенная экспрессия ММП-9, ММП-2, МТ1-ММП и ТИМП-2, сопровождающаяся снижением экспрессии ТИМП-1, может способствовать более активному местному распространению рака яичников, а повышенная экспрессия ММП-9 совместно с низкой экспрессией ТИМП-1 – также и распространению опухолевых клеток по лимфатическим сосудам. В другом исследовании этих же авторов [38] продемонстрировано увеличение экспрессии ММП-9 и ММП-2 в клетках рака яичников, выделенных из асцитической жидкости, по сравнению с таковой в мезотелиальных клетках, полученных из асцита при доброкачественных перитонеальных изменениях.

В то же время K. Cai и соавт. [39], исследуя методами иммуногистохимического окрашивания, зимографии, Northern- и Western- blot-анализа биоптаты и различные культуры клеток опухолей яичников, обнаружили, что ММП-9 и ММП-2 чаще выявляются в пренеопластических тканях и клетках, чем в карциномах с уже установившимся злокачественным фенотипом. Они также не выявили взаимосвязи уровня экспрессии обеих ММП со стадией заболевания и степенью злокачественности рака яичников. Более того, ММП-2, достаточно часто выявлявшаяся в пренеопластических поражениях яичников, как правило, экспрессировалась на низком

уровне или вообще отсутствовала в раковых клетках. На основании этих данных авторы предположили, что увеличение экспрессии коллагеназ происходит на ранних стадиях злокачественной трансформации эпителия яичников и является одним из этиологических факторов этого процесса и(или) фактором риска возникновения рака яичников. Косвенно это предположение подтвердили T. Paulsen и соавт. [40], исследовавшие иммуногистохимически пограничные серозные опухоли яичников 99 больных и показавшие, что интенсивное окрашивание первичной опухоли на ММП-2 достоверно чаще выявляется при наличии неинвазивных имплантатов, чем в их отсутствие (соответственно 76 и 53%). Роль опухолевой ММП-2 в качестве одного из регуляторов раннего метастазирования рака яичников в большой сальник подтверждена и в экспериментальных исследованиях на органотипических культурах и ксенографтах опухолей [18].

M. Maatta и соавт. [41, 42] сравнивали экспрессию ММП-9 и ММП-2, а также их ингибиторов 1 и 2 типа в 22 доброкачественных, 15 пограничных и 16 доброкачественных опухолях яичников. ММП-2 была обнаружена в 56% доброкачественных, 40% пограничных и 90% злокачественных опухолей, экспрессия остальных маркеров также была выше в ткани рака яичников, чем в доброкачественных и пограничных опухолях. На основании этих данных авторы пришли к заключению, что с точки зрения экспрессии коллагеназ и ТИМП пограничные опухоли яичников находятся ближе к доброкачественным новообразованиям, чем к злокачественным. Усиление экспрессии ММП-9 и ММП-2 при переходе от доброкачественных опухолей яичников к злокачественным продемонстрировали также B. Schmalfeld и соавт. [43].

M. Furuya и соавт. [44] исследовали содержание и активность ММП и ТИМП в содержимом и выстилающем эпителии кист при муцинозных опухолях яичников. Активность ММП-9 была выявлена во всех злокачественных и пограничных опухолях и в 7 из 15 аденом, при этом измеренное иммуноферментным методом содержание ММП-9 в кистозной жидкости оказалось достоверно выше при карциномах, чем при пограничных и доброкачественных опухолях яичников. Активность ММП-2 при различных муцинозных поражениях яичников не зависела от их злокачественности и была практически одинаковой, а содержание этой протеазы при злокачественных опухолях хотя и было выше, чем в доброкачественных и пограничных, различия не достигали статистической значимости. Авторы отметили также достоверное повышение уровня ТИМП-1 и ТИМП-2 в муцинозных карциномах яичников по сравнению с пограничными и доброкачественными новообразованиями. В другой работе эти же авторы приводят результаты исследования 24 серозных опухолей яичников (8 аденокарцином, 2 пограничные опухоли и 14 аденом). Ими обнаружено достоверное повышение содержания ММП-9 и ММП-2 в кистозном содержимом аденокарцином по сравнению с серозными аденомами, при этом уровни ТИМП-1 и ТИМП-2 в злокачественных и доброкачественных новообразованиях не различались [45]. L. Huang и соавт. [46] методами иммуногистохимии и гибридизации *in situ* исследовали 90 эпителиальных опухолей яичников различной злокачественности и продемонстрировали достоверное увеличение экспрессии ММП-9 в серозных и муцинозных карциномах по сравнению с доброкачественными и пограничными опухолями. В противоположность другим авторам, они также показали, что уровень ТИМП-1 – ингибитора, образующего комплексы с активной формой ММП-9, был повышен как в злокачественных, так и в пограничных опухолях яичников по сравнению с доброкачественными новообразованиями.

Наибольший интерес представляют работы, в которых оценено значение различных ММП для прогноза рака яичников. Так, в одном из наиболее ранних исследований по этой проблеме B. Davidson и соавт. [47], определяя экспрессию ММП-2 и ММП-9 в первичных опухолях и метастазах 45 больных распространенным (III – IV стадия FIGO) раком яичников методом *in situ* гибридизации мРНК, показали, что высокий уровень экспрессии мРНК обеих коллагеназ в опухолевых клетках является фактором неблагоприятного прогноза безрецидивной и общей выживаемости. Они подтвердили эти данные в дальнейшем [48], оценив ретроспективно 20-летнюю выживаемость больных, однако исследования других авторов показали, что зависимость эта не столь однозначна.

Одной из наиболее значимых следует признать публикацию S. Sillanpaa и соавт. [49], проанализировавших 292 образца эпителиального рака яичников. В этом исследовании показано, что ММП-9 присутствует почти во всех исследованных тканях, однако клиническое значение экспрессии этой протеазы в эпителиальных опухолевых клетках и в строме противоположно. Так, с увеличением распространенности процесса уменьшается процент опухолевых клеток с высокой экспрессией ММП-9 и увеличивается доля таких клеток в строме. В соответствии с этим при однофакторном анализе в общей группе больных было продемонстрировано увеличение 10-летней выживаемости при высоком уровне экспрессии ММП-9 в опухоли и ее уменьшение – при высокой экспрессии этой протеазы в строме. Интересно, что при многофакторном анализе сохранилось только прогностическое значение уровня экспрессии ММП-9 в опухолевых клетках при I стадии заболевания по FIGO. Авторы предположили, что ММП-9 играет двойную роль в прогрессии рака яичников: препятствует распространению опухоли, если на-

ходится на эпителиальных клетках, и способствует ему, находясь на клетках стромы.

В аналогичном исследовании, включавшем 90 больных [7], высокая экспрессия ММП-9 была выявлена в опухолевых клетках в 97% случаев, в клетках стромы – в 70%, а ММП-2 – соответственно в 54 и 38% случаев. Высокая стромальная экспрессия обеих ММП была ассоциирована с такими показателями агрессивности процесса, как поздняя клиническая стадия, наличие асцита, положительный статус лимфатических узлов.

При однофакторном анализе по методу Каплана–Мейера показателем неблагоприятного прогноза общей выживаемости оказалась высокая экспрессия ММП-9 и ММП-2 не только в строме, но и в эпителиальных опухолевых клетках, однако при многофакторном тесте независимым прогностическим фактором оказалась только стромальная ММП-9. S. Ozalp и соавт. [50] ретроспективно исследовали опухоли 45 больных с эпителиальными опухолями яичников (30 – злокачественными и 15 – пограничными), оценивая интенсивность иммуногистохимического окрашивания на ММП-9 по 3-балльной шкале. Интенсивность окрашивания эпителиальных клеток в злокачественных опухолях была более высокой, чем в пограничных, а уровень экспрессии ММП-9 в строме злокачественных и пограничных опухолей достоверно не различался. Уровень экспрессии ММП-9 в эпителиальных клетках злокачественных опухолей не зависел от стадии заболевания и не влиял на выживаемость. В то же время, как и в описанных выше исследованиях, высокий уровень экспрессии ММП-9 в строме рака яичников оказался фактором неблагоприятного прогноза. A. Demeter и соавт. [51], оценивавшие зимографически желатиназную активность ММП-2 и ММП-9 в экстрактах опухолей, асцитической жидкости и сыворотке крови 27 больных с гистологически верифицированными эпителиальными опухолями яичников, показали, что только активность ММП-9 была достоверно повышена в опухолях и асците у пациентов, у которых в ходе 30-месячного наблюдения возник рецидив (в отличие от больных без рецидивов).

В большом ретроспективном исследовании [52] иммуногистохимически была оценена экспрессия ММП-2 в 295 первичных опухолях и 67 метастазах эпителиального рака яичников. Показано, что низкая экспрессия этой протеазы в опухолевых клетках ассоциирована с III степенью злокачественности и эндометриоидным типом опухоли. При многофакторном анализе высокая экспрессия ММП-2 в опухолевых клетках оказалась фактором благоприятного прогноза 10-летней безрецидивной выживаемости пациентов с эпителиальным раком яичников. В то же время M. Perigny и соавт. [53], исследовав ретроспективно опухоли и перитонеальные имплантаты 100 оперированных в 1990–2000 гг. больных раком яичников III стадии, показали, что гиперэкспрессия ММП-2 в опухолевых клетках перитонеальных имплантатов ассоциирована с ухудшением общей выживаемости больных по данным многофакторного анализа, при этом экспрессия этой коллагеназы в клетках первичных опухолей не влияла на прогноз. А ранее X. Wu и соавт. [54], используя комплекс методов (полуколичественный РТ-ПЦР-анализ, иммуногистохимию, иммуноблоттинг), показали, что уровень экспрессии ММП-2 в карциномах яичников выше, чем в доброкачественных эпителиальных опухолях, не зависит от основных клинико-морфологических характеристик, но является фактором неблагоприятного прогноза.

Еще в одном исследовании [55] изучали экспрессию ММП-2, активатора ММП-2, МТ1-ММП и ТИМП-2 в 35 эндометриоидных и 49 серозных аденокарциномах яичников, сопоставляя результаты со стадией заболевания, степенью злокачественности и размером опухоли, а также безрецидивной и общей выживаемостью больных. Однофакторный анализ показал, что высокая стромальная экспрессия ММП-2 достоверно связана с распространенной стадией, высокой злокачественностью и серозным гистотипом опухоли, меньшим размером первичной опухоли во время операции, а также с большей частотой рецидивов заболевания. Однако уровень экспрессии ММП-2 не влиял на показатель смертности больных. При многофакторном анализе стромальная экспрессия ММП-2 влияла только на выживаемость больных эндометриоидным раком яичников и была для них наиболее значимым фактором прогноза.

Матрилизин – матриксная металлопротеиназа 7 (ММП-7). В подгруппу матрилизинов, помимо ММП-7, входит также относительно мало изученная ММП-26, называемая эндометазой или малой протеазой эндометрия. Помимо разрушения компонентов внеклеточного матрикса, ММП-7 участвует в процессинге некоторых биологически важных молекул клеточной поверхности – Fas-лиганда, про-ФНО-α, Е-кадгерина и др. Секреция ММП-7 клетками эпителиального рака яичников стимулируется VEGF и интерлейкином-8. В опытах *in vitro* показано, что ММП-7 увеличивает инвазивность клеток рака яичников, активируя про-ММП-2 и про-ММП-9 [56].

Впервые усиление экспрессии ММП-7 в опухолях яичников продемонстрировано H. Tanimoto и соавт. [57], исследовавшими методом количественного ПЦР-анализа 32 карциномы, 12 пограничных опухолей и 10 неизмененных яичников. Уровень мРНК этой протеазы оказался повышенным примерно в 75% как злокачественных, так и пограничных опухолей. В дальнейшем эта же группа авторов [58], исследовав 44 муцинозных опухоли яичников, иммуногистохимически подтвердила увеличение

экспрессии матрилизина в клетках опухолей яичников, независимо от степени их злокачественности. ММП-7 обнаружена и в слизистом секрете этих опухолей. В то же время при анализе серозных опухолей яичников было показано, что казеинолитическая активность ММП-7 чаще выявляется в злокачественных опухолях (87%), чем в доброкачественных (28%) [45]. Интересно, что в отличие от описанных выше желатиназ ММП-7 не была обнаружена в строме рака яичников [6].

Наиболее репрезентативным стало исследование клинического значения ММП-7 при эпителиальном раке яичников [59], в котором иммуногистохимически были исследованы 284 образца первичной опухоли, 36 метастазов и 8 неизмененных яичников. В опухолях эндометриоидного строения большая площадь и высокая интенсивность окрашивания на ММП-7 были достоверно ассоциированы с положительным окрашиванием ядер клеток на β-катенин. Во всей группе в целом и в подгруппе неэндометриоидного рака низкая частота окрашивания на ММП-7 коррелировала с высокой степенью злокачественности опухоли, распространенной стадией заболевания и большим объемом остаточной первичной опухоли после операции. Оцененные ретроспективно 10-летняя безрецидивная и общая выживаемость больных оказались значительно лучше при высоком проценте интенсивного окрашивания на ММП-7, чем при низком, причем при многофакторном анализе этот показатель оказался независимым показателем благоприятного прогноза.

A. Acar и соавт. [60] методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли содержание ММП-7 в сыворотке крови 28 больных раком яичников, 2 – с пограничными опухолями, 10 женщин с доброкачественными гинекологическими заболеваниями и 30 здоровых женщин. Уровень ММП-7 у больных раком яичников был достоверно выше, чем в контрольной группе, и понижался после удаления опухоли, а при доброкачественных опухолях яичников был промежуточным между таковым в контроле и у больных раком (без достоверных различий с этими группами).

По данным исследователей [61], содержание ММП-7 в сыворотке крови является достаточно чувствительным (80%) и специфичным (87,5%) маркером для дифференциальной диагностики рака яичников, лишь незначительно уступая классическому показателю CA-125. Более того, сочетанное использование CA-125, ММП-7 и 2 других маркеров (хемокиновых лигандов CCL11 и CCL18) позволяет выявить ранний рак яичников с чувствительностью 94,4%.

По нашим данным, полученным при обследовании 84 первичных больных с различными новообразованиями яичников [62], ММП-7 является значимым серологическим маркером рака яичников. Чувствительность этого теста относительно контроля при 95% специфичности составляет 78%. Уровень ММП-7 также положительно коррелирует с ключевыми показателями распространенности рака яичников: стадией заболевания, размером первичной опухоли, наличием и характером диссеминации по брюшине и метастазов в большом сальнике, наличием и количеством асцита. Предлагалось также включить уровень ММП-7 в комплексный мультианалитный тест для дифференциальной диагностики рака яичников [63].

Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 1 (МТ1-ММП или ММП-14) представляет собой трансмембранную коллагеназу. Активная МТ1-ММП служит рецептором клеточной мембраны для формирования латентного комплекса ММП-2 (про-ММП-2) и тканевого ингибитора ТИМП-2. Она протеолитически активирует на клеточной поверхности про-ММП-2, разрушающую коллаген IV типа, а также сама гидролизует коллагены I, II и III типов и некоторые другие белки ВКМ. МТ1-ММП задействована на многих этапах метастазирования рака яичников [64], в частности, она участвует в формировании и диссеминации по брюшине мультиклеточных агрегатов, слущивающихся с поверхности опухоли в брюшную полость [65]. Вместе с другими ММП она способствует формированию так называемого «коллагенолитического» инвазивного фенотипа рака яичников.

Иммуногистохимически выраженная экспрессия МТ1-ММП в эпителиальных опухолевых клетках рака яичников выявлена A. Kamat и соавт. [7] в 100% случаев, в стромальных клетках – только в 38%. Высокая экспрессия этой протеазы в строме была ассоциирована с клинико-морфологическими признаками агрессивности процесса – поздней стадией, высокой степенью злокачественности опухоли, наличием метастазов в лимфатических узлах и асцита. Уменьшение безрецидивной выживаемости больных было связано с высокой экспрессией МТ1-ММП как в строме, так и в эпителии, а наиболее значимым фактором неблагоприятного прогноза оказалась высокая эпителиальная экспрессия МТ1-ММП.

Ретроспективный анализ 20-летней выживаемости больных раком яичников III–IV стадии в зависимости от уровня экспрессии мРНК МТ1-ММП, определенного методом гибридизации *in situ*, также подтвердил неблагоприятное влияние повышенной экспрессии этой ММП на прогноз [47, 48]. Кроме того, эти авторы подтвердили наблюдение A. Kamat и соавт. о том, что в отличие от других ММП, МТ1-ММП выявляется преимущественно в эпителиальных опухолевых клетках и почти отсутствует в строме [48, 66]. Неблагоприятная роль МТ1-ММП, особенно при ее коэкспрессии с ММП-2 и ТИМП-2, в прогнозе выживаемости больных раком яичников продемонстрирована также K. Sakata и соавт. [37]. В одной из недавних работ продемонстрирована важная роль

МТ1-ММП (ММП-14) в пролиферации и метастазировании редкой формы рака яичников – светлоклеточной аденокарциномы [67].

Тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ. В ткани рака яичников ТИМП-1 и ТИМП-2 находятся как в стромальных областях, так и в опухолевых клетках.

Данные о соотношении уровня экспрессии ТИМП-1 в злокачественных, пограничных и доброкачественных опухолях яичников немногочисленны и противоречивы. Так, M. Furuya и соавт. продемонстрировали иммуноферментным методом увеличение содержания этого маркера в кистозной жидкости больных серозным [45, 61, 68] и муцинозным [44] раком яичников. B. Davidson и соавт. [48] выявили увеличение уровня экспрессии ТИМП-1 в ткани рака яичников иммуногистохимически и методом *in situ* гибридизации. В то же время K. Sakata и соавт. [37] обнаружили, что диффузное иммуногистохимическое окрашивание на ТИМП-1 было интенсивнее в доброкачественных и пограничных опухолях, чем в аденокарциномах яичников. Более того, по данным этих авторов, высокая экспрессия ТИМП-1, особенно в сочетании с низкой экспрессией ММП-9, способствует метастазированию рака яичников в лимфатические узлы.

Наиболее интересные результаты получены при исследовании уровня ТИМП-1 в сыворотке крови. Так, M. Maatta и соавт. [42] предложили использовать сывороточный ТИМП-1 для дифференциальной диагностики опухолей яичников с высоким и низким злокачественным потенциалом. По их данным, уровень ТИМП-1 в сыворотке крови больных достоверно возрастает при переходе от доброкачественных (137–616 нг/мл; медиана – 250 нг/мл) к пограничным (63–587 нг/мл; медиана – 357 нг/мл) и далее к злокачественным (199–983 нг/мл; медиана 443 нг/мл). M. Rauvala и соавт. [69] также показали, что высокая концентрация ТИМП-1 в сыворотке крови пациентов с опухолями яичников во время постановки диагноза коррелировала со злокачественным фенотипом опухоли, а у больных раком – с агрессивным фенотипом и неблагоприятным прогнозом: повышенный уровень ТИМП-1 обнаружен при распространенных стадиях заболевания, размере остаточной опухоли >2 см, плохом ответе на цитотоксическую терапию, более короткой безрецидивной и общей выживаемостью. Авторы считают, что повышенный дооперационный уровень ТИМП-1 в сыворотке крови является фактором неблагоприятного прогноза рака яичников. В то же время в другом исследовании они не обнаружили взаимосвязи динамики уровня ТИМП-1 в процессе химиотерапии с ее эффективностью [70]. Ранее неблагоприятное прогностическое значение высоких показателей ТИМП-1 в плазме крови больных раком яичников продемонстрировали L. Manenti и соавт. [26].

В исследовании, проведенном параллельно на образцах тканей и культурах клеток опухолей яичников T. Kim и соавт. [71] показали, что гиперэкспрессия ТИМП-2 в клетках рака яичников ингибирует апоптоз, индуцированный цисплатином, и индуцирует ММП-2; на этом основании они считают, что ТИМП-2 может способствовать росту серозных опухолей яичников. В подтверждение этого предположения, B. Davidson и соавт. [47, 48] продемонстрировали неблагоприятное прогностическое значение высокой экспрессии мРНК и белка ТИМП-2 в опухолевых и стромальных клетках распространенного рака яичников, причем уровень экспрессии ТИМП-2 в строме оставался значимым показателем прогноза и при многофакторном анализе. В то же время некоторые другие исследователи [26, 55] не подтвердили роли ТИМП-2 в прогнозе рака яичников. По данным K. Sakata и соавт. [37], экспрессия ТИМП-2 повышена в злокачественных опухолях яичников по сравнению с доброкачественными и пограничными. Кроме того, тройное диффузное положительное иммуногистохимическое окрашивание на ТИМП-2, ММП-2 и МТ1-ММП было ассоциировано с распространенными стадиями и высокой степенью злокачественности рака яичников. M. Maatta и соавт. [41] также выявили более высокую экспрессию ТИМП-2 в злокачественных опухолях, чем в пограничных и злокачественных. Однако T. Okamoto и соавт. [72], сравнивавшие экспрессию нескольких ММП и ТИМП в опухолях и окружающих гистологически неизмененных тканях больных раком яичников различного гистологического строения, утверждают, что повышенная экспрессия ТИМП-2 наблюдается только при светлоклеточном раке и является уникальным свойством этого довольно редкого гистологического варианта рака яичников.

В отличие от ТИМП-1, уровень ТИМП-2 в сыворотке крови больных раком яичников не был связан с клинико-морфологическими особенностями и прогнозом заболевания [69], но имел тенденцию к повышению у больных раком по сравнению с таковым у здоровых женщин. При этом у больных с полным ответом на химиотерапевтическое лечение после оптимально проведенной операции отмечен более высокий уровень ТИМП-2, чем у больных с частичным ответом [70].

В единичных исследованиях продемонстрирован также рост экспрессии ТИМП-3 и ТИМП-4 по мере увеличения инвазивности рака яичников [73, 74], однако дальнейшего прикладного развития эти работы пока не получили.

ММП КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

На экспериментальных моделях разработано несколько подходов к использованию ММП в качестве мишеней для противоопухолевой терапии:

1) блокирование синтеза ММП;

2) подавление взаимодействия ММП с молекулами, направляющими их к клеточной поверхности и межклеточному пространству;

3) ингибирование ферментативной активности ММП.

Прямое подавление синтеза ММП осуществляется с помощью трансфекции в клетки антисмысловых (ас) мРНК или олигонуклеотидов. В частности, показано, что антисмысловая мРНК к ММП-9 понижает инвазивность культивируемых клеток рака яичников и их прикрепление к поверхностям, покрытым фибронектином [75]. Использование ас-мРНК против ММП-7 снижало количество этого фермента в культивируемых клетках рака яичников и подавляло их инвазию, индуцированную лизофосфатидиловой кислотой [76]. Ас-мРНК против МТ1-ММТ подавляли не только инвазию, но и пролиферацию культуры клеток рака яичников SW626 [77, 78]. Однако вопрос о возможности использования подобных технологий в клинической практике остается пока открытым. Кроме того, на уровень экспрессии ММП могут опосредованно повлиять препараты, направленные на передачу сигналов различных тирозинкиназных рецепторов (факторов роста, цитокинов) [79]. В частности, установлено, что в регуляции экспрессии и активности ММП в клетках рака яичников участвуют такие сигнальные системы, как PI3K/Akt [20, 80–82], Raf/Ras [83], циклооксигеназная [84] и др.

Подавление взаимодействия ММП с белками клеточной поверхности также может заблокировать важные для инвазии проявления их активности в межклеточном пространстве. Перспективной мишенью в этом плане является взаимодействие с интегринами и кадгеринами, способствующее слущиванию клеток рака яичников с поверхности опухоли, их диссеминации по брюшине и образованию асцита [85–87].

Ингибирование ферментативной активности ММП – самый прямой путь влияния на их проинвазивную и прометастатическую активность. Первоначально наиболее очевидным подходом представлялось использование их природных тканевых ингибиторов. В экспериментальных исследованиях был даже продемонстрирован противоопухолевый эффект ТИМП-2 и ТИМП-4 [88, 89], однако возможности системного введения ТИМП ограничены тем, что они обладают независимой от ММП проканцерогенной и проангиогенной активностью [4, 10, 15]. В связи с этим разрабатываются синтетические высокоспецифичные ингибиторы ММП (большинство из них – производные гидроксамовой кислоты), которые могли бы создавать эффективные концентрации в крови и вызывать регрессию опухоли. Клинические испытания проходили 5 ингибиторов ММП [12]: Маримастат – исследовался при ранних стадиях рака поджелудочной железы, BMS-275291 – при прогрессирующем немелкоклеточном раке легкого, Приномастат – при ранних стадиях различных солидных опухолей, Метастат (тетрациклиновые ингибиторы ММП) – при саркоме Капоши, Неовастат – при неоперабельном раке почки. Однако при применении этих препаратов возникло много различных проблем. Уже ранние исследования I фазы показали, что длительное введение ингибиторов ММП сопряжено с появлением мышечных болей у 30% больных и воспалительных процессов, которые не наблюдались в доклинических исследованиях. Маримастат и Приномастат показали минимальный эффект у больных с диссеминацией. Клинические исследования BAY-129566 были прекращены на ранних этапах из-за низкой выживаемости больных. Следует также отметить, что ингибиторы ММП – цитостатические препараты, и их биологическая активность во II фазе клинических испытаний определялась не по уменьшению размеров опухоли, а по снижению темпов возрастания уровня опухолевых маркеров в сыворотке крови больных (в частности, для Маримастата). Большинство препаратов сразу после испытаний I фазы изучались во II/III фазах без проведения исследований на небольших группах больных. Возможно, именно по этим причинам результаты III фазы клинических испытаний ингибиторов ММП оказались неудовлетворительными. В большинстве исследований эти препараты оказались неэффективными, а в ряде случаев даже ухудшали результаты химиотерапии.

Предполагается, что неэффективность синтетических ингибиторов ММП может объясняться либо включением в исследование больных на поздних стадиях опухолевого процесса, либо тем, что препараты имели низкую специфичность и, возможно, ингибировали и ММП с собственной противоопухолевой активностью либо высокой частотой ревматоидоподобных воспалительных реакций, что ограничивало возможность продолжения лечения препаратом в эффективных дозах. Осложнения имели обратимый характер, но ограничивали возможность использования доз, продемонстрировавших эффективность в доклинических исследованиях, поэтому в последующем их пришлось уменьшить. До сих пор не решен и вопрос о том, какие ММП связаны с появлением побочных реакций (мышечные боли), а какие являются мишенью для противоопухолевой терапии.

В настоящее время разрабатываются ингибиторы ММП следующего поколения, обладающие высокой специфичностью к ММП одного типа [90]. Кроме того, изучение спектра, уровня и соотношения экспрессии различных видов ММП и их тканевых ингибиторов, их биологического и прогностического значения может также оказаться полезным для разработки и эффективного применения новых ингибиторов ММП, специфичных для опухолей определенной локализации, в частности, для рака яичников, и(или) для конкретного больного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malemud C. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview // Front Biosci. – 2006; 11: 1696–701.
2. Visse R., Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry // Circ. Res. – 2003; 92 (8): 827–39.
3. Westermarck J., Kahari V. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion // FASEB J. – 1999; 13 (8): 781–92.
4. Ramnath N., Creaven P. Matrix metalloproteinase inhibitors // Curr. Oncol. Rep. – 2004; 6 (2): 96–102.
5. Liotta L., Tryggvason K., Garbisa S. et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen // Nature. – 1980; 284 (5751): 67–8.
6. Furuya M., Ishikura H., Nemori R. et al. Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography // Hum. Pathol. – 2001; 32 (2): 163–8.
7. Kamat A., Fletcher M., Gruman L. et al. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer // Clin. Cancer Res. – 2006; 12 (6): 1707–14.
8. Deryugina E., Quigley J. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis // Cancer Metastasis Rev. – 2006; 25 (1): 9–34.
9. Nelson A., Fingleton B., Rothenberg M., Matrisian L. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications // J. Clin. Oncol. – 2000; 18 (5): 1135–49.
10. Deryugina E., Quigley J. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions // Biochim. Biophys. Acta. – 2010; 1803 (1): 103–20.
11. Duffy M. Proteases as prognostic markers in cancer // Clin. Cancer Res. – 1996; 2 (4): 613–8.
12. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression // Nat. Rev. Cancer. – 2002; 2 (3): 161–74.
13. Nikkola J., Vihinen P., Vuoristo M. et al. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma // Clin. Cancer Res. – 2005; 11 (14): 5158–66.
14. Nakajima M., Welch D., Wynn D. et al. Serum and plasma M(r) 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma // Cancer Res. – 1993; 53 (23): 5802–7.
15. Baker A., Edwards D., Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities // J. Cell. Sci. – 2002; 115 (Pt 19): 3719–27.
16. Jumper C., Cobos E., Lox C. Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment // Respir. Med. – 2004; 98 (2): 173–7.
17. Kenny H., Kaur S., Coussens L., Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin // J. Clin. Invest. – 2008; 118 (4): 1367–79.
18. Kenny H., Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis // Cell Cycle. – 2009; 8 (5): 683–8.
19. Ellerbroek S., Wu Y., Overall C., Stack M. Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity // J. Biol. Chem. – 2001; 276 (27): 24833–42.
20. Ellerbroek S., Halbleib J., Benavidez M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association // Cancer Res. – 2001; 61 (5): 1855–61.
21. Nishikawa A., Iwasaki M., Akutagawa N. et al. Expression of various matrix proteases and Ets family transcriptional factors in ovarian cancer cell lines: correlation to invasive potential // Gynecol. Oncol. – 2000; 79 (2): 256–63.
22. Lin S., Lee M., Ke F. et al. TGFbeta1 stimulates the secretion of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and the invasive behavior in human ovarian cancer cells, which is suppressed by MMP inhibitor BB3103 // Clin. Exp. Metastasis – 2000; 18 (6): 493–9.
23. Rodriguez G., Haisley C., Hurteau J. et al. Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta // Gynecol. Oncol. – 2001; 80 (2): 245–53.
24. Belotti D., Paganoni P., Manenti L. et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation // Cancer Res. – 2003; 63 (17): 5224–9.
25. Zhang A., Meng L., Wang Q. et al. Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up-regulation of VEGF and induction of MMP-2 // Oncol. Rep. – 2006; 15 (4): 831–6.
26. Manenti L., Paganoni P., Floriani I. et al. Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma // Eur. J. Cancer. – 2003; 39 (13): 1948–56.
27. Wang F., So J., Reierstad S., Fishman D. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases // Int. J. Cancer. – 2006; 118 (4): 879–88.
28. Belotti D., Calcagno C., Garofalo A. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion // Mol. Cancer Res. – 2008; 6 (4): 525–34.
29. Lutgendorf S., Lamkin D., Jennings N. et al. Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma // Clin. Cancer Res. – 2008; 14 (21): 6839–46.
30. Sood A., Bhatty R., Kamat A. et al. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells // Clin. Cancer Res. – 2006; 12 (2): 369–75.
31. Sood A., Fletcher M., Coffin J. et al. Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2004; 190 (4): 899–909.
32. Goldman S., Shalev E. MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology // Front. Biosci. – 2004; 9: 2474–83.
33. Lahav-Baratz S., Kraiem Z., Shiloh H. et al. Decreased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in follicular fluid from women with polycystic ovaries compared with normally ovulating patients undergoing in vitro fertilization // Fertil. Steril. – 2003; 79 (3): 567–71.
34. Lewandowski K., Komorowski J., O'Callaghan C. et al. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in women with the polycystic ovary syndrome // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006; 91 (3): 1173–7.
35. Liu B., Cai L., Lv H. et al. Raised serum levels of matrix metalloproteinase-9 in women with polycystic ovary syndrome and its association with insulin-like growth factor binding protein-1 // Gynecol. Endocrinol. – 2008; 24 (5): 285–8.
36. Naylor M., Stamp G., Davies B., Balkwill F. Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer // Int. J. Cancer. – 1994; 58 (1): 50–6.
37. Sakata K., Shigemasa K., Nagai N., Ohama K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary // Int. J. Oncol. – 2000; 17 (4): 673–81.
38. Sakata K., Shigemasa K., Uebaba Y. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 by cells isolated from the peritoneal fluid of women with ovarian carcinoma // Acta Cytol. – 2002; 46 (4): 697–703.
39. Cai K., Yang W., Capo-Chichi C. et al. Prominent expression of metalloproteinases in early stages of ovarian tumorigenesis // Mol. Carcinog. – 2007; 46 (2): 130–43.
40. Paulsen T., Ree A., Kaern J. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 in serous borderline ovarian tumors is associated with noninvasive implant formation // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2007; 28 (5): 356–63.
41. Maatta M., Santala M., Soini Y. et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors in low malignant potential ovarian tumors // Tumour Biol. – 2004; 25 (4): 188–92.
42. Maatta M., Talvensaari-Mattila A., Turpeenniemi-Hujanen T., Santala M. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in differential diagnosis between low malignant potential (LMP) and malignant ovarian tumours // Anticancer Res. – 2007; 27 (4C): 2753–8.
43. Schmalfeldt B., Prechtel D., Harting K. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer // Clin. Cancer Res. – 2001; 7 (8): 2396–404.
44. Furuya M., Ishikura H., Kawarada Y. et al. Expression of matrix metalloproteinases and related tissue inhibitors in the cyst fluids of ovarian mucinous neoplasms // Gynecol. Oncol. – 2000; 78 (2): 106–12.
45. Furuya M., Ishikura H., Ogawa Y. et al. Analyses of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cyst fluid of serous ovarian tumors // Pathobiology. – 2000; 68 (6): 239–44.
46. Huang L., Garrett A., Bell D. et al. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors // Gynecol. Oncol. – 2000; 77 (3): 369–76.
47. Davidson B., Goldberg I., Gotlieb W. et al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma // Clin. Exp. Metastasis. – 1999; 17 (10): 799–808.

48. Davidson B., Goldberg I., Gotlieb W. et al. The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma // Mol. Cell. Endocrinol. – 2002; 187 (1–2): 39–45.
49. Sillanpaa S., Anttila M., Voutilainen K. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer // Gynecol. Oncol. – 2007; 104 (2): 296–303.
50. Ozalp S., Tanir H., Yalcin O. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase-B) expression in epithelial ovarian tumors // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2003; 24 (5): 417–20.
51. Demeter A., Sziller I., Csapo Z. et al. Molecular prognostic markers in recurrent and in non-recurrent epithelial ovarian cancer // Anticancer Res. – 2005; 25 (4): 2885–9.
52. Sillanpaa S., Anttila M., Suhonen K. et al. Prognostic significance of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase 2 in epithelial ovarian cancer // Tumour Biol. – 2007; 28 (5): 280–9.
53. Perigny M., Bairati I., Harvey I. et al. Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer // Am. J. Clin. Pathol. – 2008; 129 (2): 226–31.
54. Wu X., Li H., Kang L., Li L. et al. Activated matrix metalloproteinase-2--a potential marker of prognosis for epithelial ovarian cancer // Gynecol. Oncol. – 2002; 84 (1): 126–34.
55. Torng P., Mao T., Chan W. et al. Prognostic significance of stromal metalloproteinase-2 in ovarian adenocarcinoma and its relation to carcinoma progression // Gynecol. Oncol. – 2004; 92 (2): 559–67.
56. Wang F., So J., Reierstad S., Fishman D. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase // Int. J. Cancer. – 2005; 114 (1): 19–31.
57. Tanimoto H., Underwood L., Shigemasa K. et al. The matrix metalloprotease pump-1 (MMP-7, Matrilysin): A candidate marker/target for ovarian cancer detection and treatment // Tumour Biol. – 1999; 20 (2): 88–98.
58. Shigemasa K., Tanimoto H., Sakata K. et al. Induction of matrix metalloprotease-7 is common in mucinous ovarian tumors including early stage disease // Med. Oncol. – 2000; 17 (1): 52–8.
59. Sillanpaa S., Anttila M., Voutilainen K. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 in epithelial ovarian cancer and its relation to beta-catenin expression // Int. J. Cancer. – 2006; 119 (8): 1792–9.
60. Acar A., Onan A., Coskun U. et al. Clinical significance of serum MMP-2 and MMP-7 in patients with ovarian cancer // Med. Oncol. – 2008; 25 (3): 279–83.
61. Zohny S., Fayed S. Clinical utility of circulating matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), CC chemokine ligand 18 (CCL18) and CC chemokine ligand 11 (CCL11) as markers for diagnosis of epithelial ovarian cancer // Med. Oncol. – 2009; 27 (4): 1246–53.
62. Герштейн Е.С., Левкина Н.В., Кушлинский Д.Н. и др. Клинические перспективы исследования матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных раком яичников // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011; (10): 27–34.
63. Meinhold-Heerlein I., Bauerschlag D., Zhou Y. et al. An integrated clinical-genomics approach identifies a candidate multianalyte blood test for serous ovarian carcinoma // Clin. Cancer Res. – 2007; 13 (2 Pt 1): 458–66.
64. Sodek K., Ringuette M., Brown T. MT1-MMP is the critical determinant of matrix degradation and invasion by ovarian cancer cells // Br. J. Cancer. – 2007; 97 (3): 358–67.
65. Moss N., Barbolina M., Liu Y. et al. Ovarian cancer cell detachment and multicellular aggregate formation are regulated by membrane type 1 matrix metalloproteinase: a potential role in I.p. metastatic dissemination // Cancer Res. – 2009; 69 (17): 7121–9.
66. Davidson B., Goldberg I., Berner A. et al. Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions // Am. J. Clin. Pathol. – 2001; 115 (4): 517–24.
67. Adley B., Gleason K., Yang X., Stack M. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) in epithelial ovarian cancer: high level expression in clear cell carcinoma // Gynecol. Oncol. – 2009; 112 (2): 319–24.
68. Furuya M. Analysis of matrix metalloproteinases and related tissue inhibitors in cystic fluids of ovarian tumors // Hokkaido Igaku Zasshi. – 1999; 74 (2): 145–55.
69. Rauvala M., Puistola U., Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor // Gynecol. Oncol. – 2005; 99 (3): 656–63.
70. Rauvala M., Turpeenniemi-Hujanen T., Puistola U. The value of sequential serum measurements of gelatinases and tissue inhibitors during chemotherapy in ovarian cancer // Anticancer Res. – 2006; 26 (6C): 4779–84.
71. Kim T., Rho S., Choi Y. et al. High expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in serous ovarian carcinomas and the role of this expression in ovarian tumorigenesis // Hum. Pathol. – 2006; 37 (7): 906–13.
72. Okamoto T., Niu R., Yamada S. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in clear cell carcinoma of the ovary // Mol. Hum. Reprod. – 2003; 9 (10): 569–75.
73. Hu X., Li L., Li D. et al. Expression of matrix metalloproteinases-9,2,7, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1,2,3 mRNA in ovarian tumors and their clinical significance // Ai. Zheng. – 2004; 23 (10): 1194–8.
74. Ripley D., Tunuguntla R., Susi L., Chegini N. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and -4 in normal ovary and ovarian carcinoma // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2006; 16 (5): 1794–800.
75. Hu X., Li L., Li D. et al. Inhibitory effects of antisense MMP-9 oligodeoxynucleotides on invasiveness and adherence of ovarian cancer cells // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2006; 28 (9): 662–5.
76. Wang F., Smicun Y., Calluzzo N., Fishman D. Inhibition of matrilysin expression by antisense or RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced epithelial ovarian cancer invasion // Mol. Cancer Res. – 2006; 4 (11): 831–41.
77. Wu M., Xu G., Xi L. et al. Down-regulation of MT1-MMP expression suppresses tumor cell invasion in metastatic human SW626 ovarian cancer cells // Oncol. Rep. – 2006; 15 (2): 501–5.
78. Wu M., Shi Y., Xi L. et al. Construction of antisense MT1-MMP vector and its inhibitory effects on invasion of human ovarian cancer cells // J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci. – 2005; 25 (6): 715–7.
79. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Современные представления о механизмах передачи сигналов факторов роста как основа эффективной молекулярно-наравленной противоопухолевой терапии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007; (1): 4–9.
80. Nicosia S., Bai W., Cheng J. et al. Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. – 2003; 17 (4): 927–43.
81. Zhou H., Wong A. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells // Endocrinology. – 2006; 147 (5): 2557–66.
82. Choi J., Choi K., Auersperg N., Leung P. Gonadotropins activate proteolysis and increase invasion through protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human epithelial ovarian cancer cells // Cancer Res. – 2006; 66 (7): 3912–20.
83. Ulku A., Schafer R., Der C. Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloproteinase expression in ovarian epithelial cells // Mol. Cancer Res. – 2003; 1 (14): 1077–88.
84. Lau M., Wong A., Leung P. Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells // Endocrinology. – 2010; 151 (7): 2985–93.
85. Symowicz J., Adley B., Gleason K. et al. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells // Cancer Res. – 2007; 67 (5): 2030–9.
86. Sawada K., Radjabi A., Shinomiya N. et al. c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion // Cancer Res. – 2007; 67 (4): 1670–9.
87. Shield K., Riley C., Quinn M. et al. Alpha-2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis // J. Carcinog. – 2007; 6: 11.
88. Celiker M., Wang M., Atsidaftos E. et al. Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA // Oncogene. – 2001; 20 (32): 4337–43.
89. Brand K., Baker A., Perez-Canto A. et al. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue // Cancer Res. – 2000; 60 (20): 5723–30.
90. Murphy G., Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research // Mol. Aspects. Med. – 2008; 29 (5): 290–308.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.37-006.6-078.33:577.21

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ПРОТОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

М.С. Чесноков, **Д.А. Шавочкина**, кандидат биологических наук,
А.Д. Горев, **Н.Л. Лазаревич**, доктор биологических наук
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
E-mail: lazarevich@crc.umos.ru

Протоковая аденокарцинома – самая распространенная форма опухолей поджелудочной железы, отличающаяся высокой агрессивностью, сложностью постановки диагноза, крайне неблагоприятным прогнозом и устойчивостью к стандартным методам терапии. Разработка эффективных методов ранней диагностики и терапии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (ПАКПЖ) является одной из актуальных задач современной клинической онкологии.

В последнее время более перспективным направлением в решении этой проблемы становится поиск специфических молекулярных маркеров этого типа опухолей. В настоящее время единственным широко используемым маркером ПАКПЖ является CA 19-9, однако его чувствительность и специфичность ниже оптимальных значений. Новые многообещающие биомаркеры этого типа опухолей активно исследуются на предмет эффективности и возможности использования в клинической практике. В обзоре рассмотрены наиболее значимые молекулярные маркеры ПАКПЖ, проанализированы их диагностическое, прогностическое и предиктивное значение, а также целесообразность клинического использования.

Ключевые слова: *протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, биомаркеры, ранняя диагностика, прогностический фактор, предиктивное значение*

MOLECULAR BIOMARKERS OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA AND THEIR USEFULNESS IN CLINICAL PRACTICE

M.S. Chesnokov, D.A. Shavochkina, A.D. Gorev, N.L. Lazarevich
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Ductal adenocarcinoma is the most common type of pancreatic tumors that is notable for its highly aggressive phenotype, difficulties in diagnosis establishing, exceptionally unfavorable prognosis and resistance to standard methods of therapy . The development of relevant methods for early diagnostics and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a challenging task of modern clinical oncology.

Lately the search for specific molecular markers of this tumor type has become an increasingly promising field in solving this problem. Up to date the single widely used PDAC marker is CA 19-9, but its sensitivity and specificity are below optimal values. New promising biomarkers of this tumor are under extensive investigation for their efficiency and usefulness in clinical practice. In this review the most significant molecular PDAC markers, their diagnostic, prognostic and predictive value in terms of feasibility of clinical use are considered.

Key words: *pancreatic ductal adenocarcinoma, biomarkers, early diagnosis, prognostic factor, predictive significance*

Опухоли поджелудочной железы (ПЖ) относятся к наиболее агрессивным типам злокачественных новообразований и занимают 4-е место по смертности среди всех опухолей. Показатель 5-летней выживаемости пациентов с опухолями ПЖ не превышает 6% [1]. Около 95% опухолей этого органа представлены протоковой аденокарциномой (ПАКПЖ), которая отличается поздними сроками диагностики, высокой скоростью прогрессии и крайне неблагоприятным прогнозом.

Высокий уровень смертности больных ПАКПЖ обусловлен как сложностью ранней диагностики этого заболевания, так и низкой эффективностью существующих методов его терапии. Ранние стадии развития ПАКПЖ представлены неинвазивными панкреатическими внутрипротоковыми неоплазиями (ПанИН) и внутрипротоковыми панкреатическими муцинозными неоплазиями (ВПМН), в ходе прогрессии которых образуется инвазивная опухоль [2]. Особенно актуальна сегодня задача поиска новых высокоэффективных способов диагностики этих новообразований. Второе направление исследований – поиск факторов, определяющих эффективность выбора методов противоопухолевой терапии и длительность жизни пациентов. В настоящее время наибольший успех достигнут в исследованиях, направленных на поиск специфических молекулярных опухолевых маркеров.

Все известные биомаркеры можно классифицировать по структуре молекулы и по клиническому значению. По структуре маркеры делят на генетические (изменение структуры гена), белковые (изме-

нение уровня синтеза или структуры белка) и РНК-маркеры (изменение уровня экспрессии кодирующих и микроРНК). В зависимости от клинического значения выделяют диагностические (выявление заболевания), прогностические (предсказание длительности жизни пациента) и предиктивные (предсказание эффективности методов терапии) биомаркеры. В настоящем обзоре рассмотрены наиболее исследованные и многообещающие молекулярные маркеры ПАКПЖ и проанализирована целесообразность их применения в клинической практике (см. таблицу).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

К генетическим маркерам относятся любые изменения нуклеотидной последовательности генов: точечные мутации, делеции, амплификации и т.д. Возможность выявления мутаций в последовательностях отдельных генов помогает не только глубже понять механизмы развития опухолей, но и предсказать риск возникновения или эффективность терапии уже имеющихся новообразований. Таким образом, потенциал использования генетических маркеров в клинической онкологии очень высок [3].

Многочисленные исследования позволили установить набор основных генов, мутации и изменения активности которых наиболее характерны для клеток ПАКПЖ – *KRAS, TP53, CDKN2A* и *SMAD4* [4, 5].

KRAS. Нарушение функции белка K-Ras, одного из важнейших сигнальных белков клетки, является критическим событием в развитии опухолей ПЖ. Мутации гена *KRAS* обнаруживают в 70–90% образцов ткани опухоли, а также в ДНК из панкреатического сока пациентов, больных ПАКПЖ [6]. В результате мутаций (чаще всего в кодоне 12) K-Ras переходит в конститутивно активированную форму, что приводит к поддержанию внутри клетки постоянного митогенного сигнала и потере чувствительности к внешним ростовым факторам [7].

Мутации *KRAS* – одни из самых ранних событий при развитии ПАКПЖ, что теоретически может быть использовано для ее ранней диагностики. Вероятность их появления намного выше при опухолевой трансформации клеток ПЖ, чем при хроническом панкреатите, и увеличивается по мере прогрессии ПанИН [7]. Чувствительность определения мутаций *KRAS* в ДНК, содержащейся в образцах кала и пан-

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ, ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРЕДИКТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПАК ПЖ

Биомаркер	Изменение	Диагностическое значение		Прогностическое значение	Предиктивное значение
		чувствительность, %	специфичность, %		
KRAS	↑	70–94	49–81	Низкое	Нет
TP53	↓	50–75	43	Нет	Нет
CDKN2A	↓	Отс.	Отс.	Низкое	5-FU, гемцитабин
SMAD4	↓	50–54	57	Благоприятное	Гемцитабин
BRCA2	↓	Низкое		Отс.	Ингибиторы PARP, соединения платины
CA 19-9	↑	70–90	68–91	Неблагоприятное	5-FU, гемцитабин
CEA	↑	40	77	Нет	Нет
CA 125	↑	57–63	71–78	Неблагоприятное	–//–
CA 242	↑	71–77	91–94	–//–	–//–
CA 50	↑	82–91	85–89	Отс.	–//–
MUC1	↑	40–96	74–100	Неблагоприятное	–//–
MUC4	↑	85–94	78	–//–	Гемцитабин, бортезомиб
MUC5AC	↑	79–82	56	–//–	Нет
S100P	↑	95–100	95–100	Отс.	Отс.
DJ-1	↑	79–80	88	Неблагоприятное	–//–
miR-21	↑	83	93	–//–	Гемцитабин
miR-155	↑	81	98	Отс.	Отс.
miR-196a	↑	Отс.	Отс.	Неблагоприятное	–//–
miR-142-5p	↓	Нет	Нет	–//–	Гемцитабин
miR-201	↓	Нет	Нет	–//–	–//–

Примечание. Отс. – данные отсутствуют.

креатического сока пациентов с опухолями ПЖ, довольно высока, но специфичность метода недостаточна для его эффективного применения [8]. Достаточно чувствительных методов выявления мутаций *KRAS* в образцах сыворотки пока не предложено. Прогностическая роль мутаций гена *KRAS* в ткани ПАКПЖ невелика, однако их наличие в клетках неопухолевой ткани, прилежащих к границам опухоли, достоверно коррелирует с продолжительностью жизни пациента после операционного вмешательства [9].

TP53. Регулятор транскрипции p53 – важнейший онкосупрессорный белок, контролирующий клеточную пролиферацию путем остановки клеточного цикла или индукции апоптоза. 50–75% образцов ПАКПЖ характеризуются нарушением функций белка p53, вызванным делецией последовательности гена или соматическими мутациями [10, 11]. Нарушения функций p53 характерны для поздней стадии ПанИН3 и инвазивной карциномы, поэтому диагностический потенциал этого маркера не так высок, как в случае *KRAS* [12]. Чувствительность и специфичность определения мутаций *TP53* в образцах кала и желчи пациентов с опухолями ПЖ слишком низка для того, чтобы использовать его для скрининга населения [8, 11]. Достоверной корреляции между уровнями экспрессии или мутациями гена *TP53* в ПАКПЖ и выживаемостью пациентов не выявлено [13].

CDKN2A. Локус *CDKN2A*, находящийся на 9 хромосоме (9q21), кодирует 2 белка-опухолевых супрессора – $p16^{INK4A}$ и $p14^{ARF}$, регулирующих различные стадии клеточного цикла. Нарушения экспрессии гена *CDKN2A* наблюдаются в преобладающем (95%) большинстве опухолей ПЖ [14]. Мутации гена *CDKN2A* могут быть обнаружены уже на стадии ПанИН 2 и значительно чаще встречаются при опухолях ПЖ, чем при хроническом панкреатите [5], что делает этот ген потенциальным ранним диагностическим маркером ПАКПЖ. Сегодня в литературе не представлены успешные исследования по определению мутаций *CDKN2A* в сыворотке крови или выделениях больных с опухолями ПЖ.

Прогностическое значение нарушения экспрессии *CDKN2A* в ПАКПЖ неоднозначно. В ряде исследований отмечено отсутствие связи между мутациями *CDKN2A* и продолжительностью жизни пациентов [13], однако некоторые авторы описывают корреляцию уровня экспрессии этого гена с клинико-патологическими характеристиками опухолей и постоперационной выживаемостью [15]. Мутации *CDKN2A* являются одним из определяющих условий для развития устойчивости ПАКПЖ к химиотерапевтическим препаратам гемцитабину, митомицину С и 5-фторурацилу [16, 17].

SMAD4. Транскрипционный фактор SMAD4 является важным звеном передачи сигнала по TGFβ-зависимому пути. Для опухолей ПЖ частота инактивации *SMAD4* составляет около 50% [5].

Делеции или мутации гена *SMAD4* возникают, как правило, на поздних стадиях прогрессии ПанИН, поэтому его диагностическое значение невелико [5]. Выявление мутаций *SMAD4* в образцах ткани опухоли и желчи пациентов с ПАКПЖ обладает слишком низкой специфичностью для его эффективного применения [4, 11].

Исчезновение экспрессии гена *SMAD4* в опухолевой ткани ассоциировано с большей продолжительностью жизни пациентов после оперативного вмешательства [13]. Применение гемцитабина и других химиотерапевтических препаратов оказывает более выраженный эффект на продолжительность жизни пациентов с нарушенной экспрессией SMAD4 в опухолях [18].

BRCA2. Белки семейства BRCA занимают важное место в системах репарации повреждений ДНК. Нарушения функции в ПАКПЖ описаны в основном для гена *BRCA2* – его мутации наблюдаются примерно у 10% пациентов с ПАКПЖ, поэтому их диагностическая ценность невелика [19]. Сведений о прогностическом значении *BRCA2* для ПАКПЖ в литературе не описано.

Нарушение систем репарации повреждений ДНК в *BRCA2*-дефектных опухолевых клетках ПЖ значительно повышает их чувствительность к ингибиторам поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) и ДНК-повреждающим веществам (митомицин С, соединения платины) [20, 21]. Поэтому обнаружение мутаций гена *BRCA2* в образцах ПАКПЖ является значимым фактором при назначении пациенту адъювантной терапии препаратами-ингибиторами PARP и ДНК-повреждающими соединениями.

БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ

Изменение уровня синтеза белков в опухолях по сравнению с нормальной тканью – классическое поле для поиска биомаркеров. В опухолях изменяется уровень синтеза нескольких десятков или сотен белков, поэтому разработка специфичных и чувствительных панелей белковых маркеров для отдельных типов опухолей остается актуальной задачей современной молекулярной онкологии [3].

Белковые биомаркеры можно разделить на 2 большие группы: секретируемые и тканевые. Основное из различие заключается в невозможности использования тканевых маркеров для массовой рутинной диагностики (скрининга) опухолевых заболеваний ввиду сложности получения образцов. Поэтому наибольший интерес представляют специфические изменения синтеза секретируемых белков.

CA 19-9. CA 19-9 – сывороточный гликопротеин с высокой молекулярной массой, который представляет собой сиалированное производное антигена (а) Льюиса (Le^a). В норме CA 19-9 синтезируется в экзокринных эпителиальных клетках и включается в состав мембраны эритроцитов [22].

Диагностической ценности для скрининга опухолей ПЖ CA 19-9 не имеет [23]. В группах пациентов с выраженными симптомами заболеваний ПЖ эффективность CA 19-9 значительно повышается; чувствительность составляет 70–90%, специфичность – 68–91% [24]. Однако такие показатели не позволяют отнести CA 19-9 к надежным диагностическим маркерам, так как повышение его уровня в сыворотке крови наблюдается также при других формах опухолей (холангиокарцинома, нейроэндокринные опухоли) и при некоторых неопухолевых заболеваниях (панкреатит, язва желудка, дивертикулит и др.) в 10–30% случаев [22].

Намного выше значение CA 19-9 как прогностического маркера при резектабельных опухолях ПЖ. Предоперационный уровень CA 19-9 в сыворотке крови коррелирует с продолжительностью жизни пациентов после оперативного вмешательства; большинство исследователей приводят в качестве порогового значения 37 ед/мл. Средняя продолжительность жизни пациентов с предоперационным уровнем CA 19-9 ниже этого значения составляет 32–36 мес, выше – 12–15 мес [22]. Снижение уровня CA 19-9 после резекции опухоли является независимым благоприятным прогностическим фактором [25]. Повышенный послеоперационный уровень CA 19-9 (>90 ед/мл) ассоциирован с низкой эффективностью адъювантной химиотерапии гемцитабином и 5-фторурацилом [26].

CEA, CA 125, CA 242 и CA 50. Помимо CA 19-9, в качестве потенциальных маркеров опухолей ПЖ рассматриваются и другие гликопротеины, содержание которых в крови повышается при развитии опухолей – CEA, CA 125, CA 242 и CA 50. Чувствительность и специфичность CEA и CA 125 уступают таковым для CA 19-9; использование CA 125 совместно с CA 19-9 несколько повышает чувствительность и специфичность диагностики ПАКПЖ [27]. Уровень CA 125 в сыворотке крови пациентов с опухолями ПЖ обладает высоким прогностическим значением, особенно в сочетании с CA 19-9 [28].

CA 242 и CA 50 экспрессируются совместно с CA 19-9 в составе общего макромолекулярного комплекса гликопротеинов. Их чувствительность сравнима с таковой для CA 19-9, но специфичность превышает наблюдаемую для CA 19-9, особенно в случае CA 242 [29]. CA 242 может рассматриваться как биомаркер опухолей ПЖ, альтернативный CA 19-9, или использоваться вместе с ним для повышения эффективности диагноза, а также в качестве независимого прогностического маркера [30].

MUC1, MUC4, MUC5AC. Муцины (MUC) – семейство высокомолекулярных мембранных и секретируемых гликопротеинов, синтезируемых эпителиальными клетками. В опухолях часто наблюдаются изменения как экспрессии отдельных генов муцинов, так и структуры белкового и полисахаридного компонентов гликопротеинов. Для опухолей ПЖ наиболее характерны изменения MUC1, MUC4 и MUC5AC.

В случае MUC1 в опухолях ПЖ наибольшим диагностическим и прогностическим потенциалом обладают гликозильные эпитопы, детектируемые моноклональными антителами DF3 и PAM4 [31, 32]. Определение PAM4 в сыворотке крови пациентов отличается высокой чувствительностью и специфичностью к ПАКПЖ при сравнении с образцами больных хроническим панкреатитом [33]. Высокий уровень синтеза DF3 в образцах ПАКПЖ ассоциирован с низкой продолжительностью жизни пациентов после резекции опухоли [31].

Высокий по сравнению с таковым в неопухолевой ткани ПЖ уровень синтеза MUC4 наблюдается в образцах ткани ПанИН3, при поздних стадиях ВПМН и инвазивной карциноме [34]. MUC4 обладает чувствительностью и специфичностью, сравнимыми с CA 19-9 и рядом других маркеров, однако эффективных методов его определения в сыворотке или выделениях пациентов пока не предложено [35]. Повышенный уровень синтеза MUC4 рассматривается как неблагоприятный прогностический фактор [36]; он также коррелирует с пониженной чувствительностью ПАКПЖ к гемцитабину, но повышает эффективность действия бортезамиба [37].

В случае MUC5AC наибольший интерес представляет использование антител к эпитопу NPC-1C, определение которого характеризуется относительно высокой чувствительностью в образцах сыворотки крови пациентов с ПАКПЖ [38]. Уровень синтеза MUC5AC повышен также в образцах ткани ВПМН, что делает его потенциальным диагностическим маркером ранних стадий канцерогенеза ПЖ [39].

Другие перспективные маркеры. Онкобелок DJ-1, кодируемый геном *PARK7*, часто гиперэкспрессирован в образцах ткани ПАКПЖ по сравнению со здоровой тканью [40]. Недавние исследования продемонстрировали, что DJ-1 может быть использован в качестве эффективного сывороточного маркера ПАКПЖ, по чувствительности и специфичности превосходящего CA 19-9. Было также показано, что высокий уровень DJ-1 в сыворотке крови является неблагоприятным прогностическим фактором [41].

Уровень синтеза Ca^{2+}-связывающего белка S100P при анализе образцов ткани ПЖ S100P может быть использован в качестве высокочувствительного (до 95%) и высокоспецифичного (до 95–100%) маркера ПАКПЖ, в том числе ее ранних стадий [42]. Прогностическая и предиктивная ценность S100P не исследована.

Наряду с перечисленными белками исследователи также рассматривают ряд других потенциальных маркеров ПЖ. Наиболее значимыми являются EGFR, HER2/neu, антиген Adnab-9, MMP-9 [43–45].

МИКРОРНК

МикроРНК (*miR*) – особый класс регуляторных некодирующих РНК, отличающихся малой длиной

(17–25 нуклеотидов). Они специфически взаимодействуют с последовательностями на 3'-конце определенных мРНК, кодирующих белки и, в зависимости от степени комплементарности, посттранскрипционно регулируют их стабильность или эффективность трансляции. В последнее время исследованию роли микроРНК в развитии опухолей уделяется все больше внимания. Исследователи описывают около 100 микроРНК, уровень экспрессии которых существенно различается в опухолевых и неизмененных протоковых клетках ПЖ [46]. Для ПАКПЖ наиболее характерны изменения экспрессии miR-21, miR-107, miR-130b, miR-142-5p, miR-143, miR-155, miR-196a, miR-204, miR-210, miR-221.

Значительное (10–12 раз) повышение экспрессии miR-21 и miR-155 наблюдается в образцах ткани опухоли пациентов с ВПМН по сравнению с таковой в неопухолевой ткани ПЖ тех же пациентов. Чувствительность и специфичность определения в образцах ткани для miR-21 составляет соответственно 83 и 93%, для miR-155 – 81 и 98%. Содержание этих микроРНК повышается также в образцах панкреатического сока пациентов с ВПМН [47]. Повышение уровней miR-21 и miR-155 может быть зафиксировано в сыворотке пациентов с патологией ПЖ, причем гиперэкспрессия miR-21 специфична только для опухолей, а miR-155 – для опухолей и хронического панкреатита [48]. Таким образом, miR-21 и miR-155 представляются многообещающими диагностическими маркерами ранних стадий ПАКПЖ. Повышенный уровень экспрессии miR-21 в ПАКПЖ является также неблагоприятным прогностическим и предиктивным фактором, коррелирует с низкой продолжительностью жизни пациентов после резекции опухоли и устойчивостью опухолевых клеток к действию гемцитабина [46, 49].

Повышенный уровень miR-196a в сыворотке крови пациентов может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение. Так, уровень экспрессии miR-196a значительно выше у пациентов с неоперабельной ПАКПЖ (III–IV стадии), чем у пациентов, для которых резекция возможна (I–II стадия). Средняя продолжительность жизни пациентов с повышенным содержанием miR-196a в сыворотке в 2 раза меньше, чем у пациентов с низким уровнем miR-196a (соответственно 6 и 12 мес) [48].

В отличие от описанных выше микроРНК, изменения экспрессии miR-142-5p и miR-204 не имеют диагностического значения, однако уровень их экспрессии снижается в гемцитабин-устойчивых клеточных культурах в опытах *in vitro*. Для пациентов, получающих курс адъювантной химиотерапии гемцитабином, пониженный уровень экспрессии этих микроРНК служит неблагоприятным прогностическим фактором [50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПАКПЖ диагностируется преимущественно на поздних стадиях развития опухоли, когда противоопухолевая терапия уже малоэффективна. В настоящее время только один из рассмотренных биомаркеров ПАКПЖ – CA 19-9 – широко применяется в клинической практике, при этом его диагностическое значение невелико. Другие потенциальные маркеры либо не обладают значимым преимуществом перед CA 19-9 по чувствительности и специфичности (CA 125, CEA, *KRAS*), либо недостаточно хорошо охарактеризованы (CA 242, MUC1, DJ-1, S100P). Помимо верификации клинического значения уже описанных маркеров, возможным путем решения проблемы эффективной диагностики ПАКПЖ является использование диагностических панелей из нескольких независимых биомаркеров. Так, описаны панели из 25 сывороточных [51] или 4 тканевых [52] белковых маркеров, позволяющие идентифицировать ПАКПЖ с чувствительностью и специфичностью, превосходящими результаты, полученные при использовании отдельных белков.

Другое перспективное направление исследования молекулярных маркеров ПАКПЖ – поиск предиктивных маркерных молекул, определяющих чувствительность опухоли к различным терапевтическим препаратам. Использование таких маркеров в клинической практике может значительно повысить эффективность назначаемой пациенту схемы лечения и станет еще одним шагом в направлении развития персонифицированной терапии. Учитывая активное внедрение молекулярно-биохимических подходов в повседневную клиническую практику, можно надеяться, что в ближайшем будущем будут подробно охарактеризованы уже известные и описаны новые высокоэффективные маркеры опухолей ПЖ.

***

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки № 8066, Российского фонда фундаментальных исследований 13-04-02080-а и благотворительного фонда «Протек».

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA // Cancer J. Clin. – 2013; 63 (1): 11–30.
2. Singh M., Maitra A. Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications // Pancreatology. – 2007; 7 (1): 9–19.
3. Dunn B., Jegalian K., Greenwald P. Biomarkers for early detection and as surrogate endpoints in cancer prevention trials: issues and opportunities // Recent Results Cancer Res. – 2011; 188: 21–47.
4. Salek C., Benesova L., Zavoral M. et al. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer // World J. Gastroenterol. – 2007; 13 (27): 3714–20.
5. Hruban R., Goggins M., Kern S. Molecular genetics and related developments in pancreatic cancer // Curr. Opin. Gastroenterol. – 1999; 15 (5): 404–9.
6. Almoguera C., Shibata D., Forrester K. et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell. – 1988; 53 (4): 549–54.
7. Lohr M., Kloppel G., Maisonneuve P. et al. Frequency of K-ras mutations in pancreatic

intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis // Neoplasia. – 2005; 7: 17–23.
8. Lu X., Xu T., Qian J. et al. Detecting K-ras and p53 gene mutation from stool and pancreatic juice for diagnosis of early pancreatic cancer // Chin. Med. J. – 2002; 115 (11): 1632–6.
9. Kim J., Reber H., Dry S. et al. Unfavourable prognosis associated with K-ras gene mutation in pancreatic cancer surgical margins // Gut. – 2006; 55 (11): 1598–605.
10. Scarpa A., Capelli P., Mukai K. et al. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations // Am. J. Pathol. – 1993; 142 (5): 1534–43.
11. Pantalone D., Pelo E., Minuti B. et al. p53 and DPC4 alterations in the bile of patients with pancreatic carcinoma // J. Surg. Oncol. 2004; 88 (4): 210–6.
12. Maitra A., Adsay N., Argani P. et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. Mod. Pathol. – 2003; 16 (9): 902–12.
13. Biankin A., Morey A., Lee C. et al. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma // J. Clin. Oncol. – 2002; 20 (23): 4531–42.
14. Schutte M., Hruban R., Geradts J. et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas // Cancer Res. – 1997; 57 (15): 3126–30.
15. Chang D., Chapman C., Norton J. et al. Expression of p16(INK4A) but not hypoxia markers or poly adenosine diphosphate-ribose polymerase is associated with improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma // Cancer. – 2010; 116 (22): 5179–87.
16. Halloran C., Ghaneh P., Shore S. et al. 5-Fluorouracil or gemcitabine combined with adenoviral-mediated reintroduction of p16INK4A greatly enhanced cytotoxicity in Panc-1 pancreatic adenocarcinoma cells // J. Gene Med. – 2004; 6 (5): 514–25.
17. Cui Y., Brosnan J., Blackford A. et al. Genetically defined subsets of human pancreatic cancer show unique in vitro chemosensitivity // Clin. Cancer Res. – 2012; 18 (23): 6519–30.
18. Bachet J., Maréchal R., Demetter P. et al. Contribution of CXCR4 and SMAD4 in predicting disease progression pattern and benefit from adjuvant chemotherapy in resected pancreatic adenocarcinoma // Ann. Oncol. – 2012; 23 (9): 2327–35.
19. Goggins M., Schutte M., Lu J. et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas // Cancer Res. – 1996; 56 (23): 5360–4.
20. Lowery M., Kelsen D., Stadler Z. et al. An emerging entity: pancreatic adenocarcinoma associated with a known BRCA mutation: clinical descriptors, treatment implications, and future directions // Oncologist. – 2011; 16 (10): 1397–402.
21. Chalasani P., Kurtin S., Dragovich T. Response to a third-line mitomycin C (MMC)-based chemotherapy in a patient with metastatic pancreatic adenocarcinoma carrying germline BRCA2 mutation // JOP. – 2008; 9 (3): 305–8.
22. Ballehaninna U., Chamberlain R. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal // J. Gastrointest. Oncol. – 2012; 3 (2): 105–19.
23. Kim J., Lee K., Lee J. et al. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2004; 19 (2): 182–6.
24. Goonetilleke K., Siriwardena A. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer // Eur. J. Surg. Oncol. – 2007; 33 (3): 266–70.
25. Montgomery R., Hoffman J., Riley L. et al. Prediction of recurrence and survival by post-resection CA 19-9 values in patients with adenocarcinoma of the pancreas // Ann. Surg. Oncol. – 1997; 4 (7): 551–6.
26. Humphris J., Chang D., Johns A. et al. NSW Pancreatic Cancer Network. The prognostic and predictive value of serum CA19.9 in pancreatic cancer // Ann. Oncol. – 2012; 23 (7): 1713–22.
27. Sakamoto K., Haga Y., Yoshimura R. et al. Comparative effectiveness of the tumour diagnostics, CA 19-9, CA 125 and carcinoembryonic antigen in patients with diseases of the digestive system // Gut. – 1987; 28 (3): 323–9.
28. Gattani A., Mandeli J., Bruckner H. Tumor markers in patients with pancreatic carcinoma // Cancer. – 1996; 78 (1): 57–62.
29. Haglund C., Lundin J., Kuusela P. et al. CA 242, a new tumour marker for pancreatic cancer: a comparison with CA 19-9, CA 50 and CEA // Br. J. Cancer. – 1994; 70 (3): 487–92.
30. Lundin J., Roberts P., Kuusela P., Haglund C. Prognostic significance of serum CA 242 in pancreatic cancer. A comparison with CA 19-9 // Anticancer. Res. – 1995; 15 (5B): 2181–6.
31. Hinoda Y., Ikematsu Y., Horinochi M. et al. Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer // J. Gastroenterol. – 2003; 38 (12): 1162–6.
32. Gold D., Karanjawala Z., Modrak D. et al. PAM4-reactive MUC1 is a biomarker for early pancreatic adenocarcinoma // Clin. Cancer Res. – 2007; 13 (24): 7380–7.
33. Gold D., Modrak D., Ying Z. et al. New MUC1 serum immunoassay differentiates pancreatic cancer from pancreatitis // J. Clin. Oncol. – 2006; 24 (2): 252–8.
34. Swartz M., Batra S., Varshney G. et al. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia // Am. J. Clin. Pathol. – 2002; 117 (5): 791–6.
35. Bhardwaj A., Marsh W., Nash J. et al. Double immunohistochemical staining with MUC4/p53 is useful in the distinction of pancreatic adenocarcinoma from chronic pancreatitis: a tissue microarray-based study // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2007; 131 (4): 556–62.
36. Saitou M., Goto M., Horinouchi M. et al. MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas // J. Clin. Pathol. – 2005; 58 (8): 845–52.
37. Wissniowski T., Meister S., Hahn E. et al. Mucin production determines sensitivity to bortezomib and gemcitabine in pancreatic cancer cells // Int. J. Oncol. – 2012; 40 (5): 1581–9.
38. Luka J., Arlen P., Bristol A. Development of a serum biomarker assay that differentiates tumor-associated MUC5AC (NPC-1C ANTIGEN) from normal MUC5AC // J. Biomed. Biotechnol. – 2011; 2011: 934757. Available at: http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/934757/ (Accessed 02 June 2013).
39. Wang Y., Gao J., Li Z. et al. Diagnostic value of mucins (MUC1, MUC2 and MUC5AC) expression profile in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens of the pancreas // Int. J. Cancer. – 2007; 121 (12): 2716–22.
40. Melle C., Ernst G., Escher N. et al. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker // Clin. Chem. – 2007; 53 (4): 629–35.
41. He X., Liu B., Yao W. et al. Serum DJ-1 as a diagnostic marker and prognostic factor for pancreatic cancer // J. Dig. Dis. – 2011; 12 (2): 131–7.
42. Nakata K., Nagai E., Ohuchida K. et al. S100P is a novel marker to identify intraductal papillary mucinous neoplasms // Hum. Pathol. – 2010; 41 (6): 824–31.
43. Dancer J., Takei H., Ro J., Lowery-Nordberg M. Coexpression of EGFR and HER-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative study using immunohistochemistry correlated with gene amplification by fluorescencent in situ hybridization // Oncol. Rep. – 2007; 18 (1): 151–5.
44. Tobi M., Kim M., Weinstein D. et al. Prospective markers for early diagnosis and prognosis of sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma // Dig. Dis. Sci. – 2013; 58 (3): 744–50.
45. Tian M., Cui Y., Song G. et al. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. BMC Cancer. – 2008; 8: 241. Available at: http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/241 (Accessed 02 June 2013).
46. Jamieson N., Morran D., Morton J. et al. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma // Clin. Cancer Res. – 2012; 18 (2): 534–45.
47. Habbe N., Koorstra J., Mendell J. et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia // Cancer Biol. Ther. – 2009; 8 (4): 340–6.
48. Kong X., Du Y., Wang G. et al. Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis // Dig. Dis. Sci. – 2011; 56 (2): 602–9.
49. Giovannetti E., Funel N., Peters G. et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity // Cancer Res. – 2010; 70 (11): 4528–38.
50. Ohuchida K., Mizumoto K., Kayashima T. et al. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer // Ann. Surg. Oncol. – 2011; 18 (8): 2381–7.
51. Wingren C., Sandström A., Segersvärd R. et al. Identification of serum biomarker signatures associated with pancreatic cancer // Cancer Res. – 2012; 72 (10): 2481–90.
52. Liu H., Shi J., Anandan V. et al. Reevaluation and identification of the best immunohistochemical panel (pVHL, Maspin, S100P, IMP-3) for ductal adenocarcinoma of the pancreas // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2012; 136 (6): 601–9.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.146-006.6-091.8-037

ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА В ОПУХОЛЯХ ПРИ РАКЕ ЭНДОМЕТРИЯ: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ

Е.С. Герштейн, доктор биологических наук, профессор, **Е.В. Грицаенко**, кандидат медицинских наук, **И.В. Терешкина**, кандидат медицинских наук, **Н.А. Огнерубов**, доктор медицинских наук, профессор, **Н.Е. Кушлинский**, член-корреспондент РАМН, профессор

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

E-mail: esgershtein@gmail.com

Иммуноферментными методами исследовано содержание VEGF и компонентов системы активации плазминогена (uPA, PAI-1 и tPA) в опухолях 121 больной раком эндометрия и в 18 образцах эндометрия с признаками гиперплазии различной степени тяжести. Концентрация uPA и PAI-1 в ткани при раке эндометрия была достоверно выше, чем в гиперплазированном эндометрии. Наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь между показателями uPA и VEGF, uPA и PAI-1, PAI-1 и VEGF и отрицательная корреляция между концентрацией tPA и uPA, а также tPA и VEGF в опухолевой ткани при раке эндометрия. Выраженная взаимосвязь с традиционными факторами прогноза рака эндометрия обнаружена для PAI-1 и VEGF: концентрация этих белков возрастает при увеличении распространенности процесса (стадия FIGO, глубина инвазии в миометрий), при уменьшении степени дифференцировки и при утрате гормоночувствительности. В то же время уровень uPA зависит только от глубины инвазии, а в опухолях с прогностически неблагоприятным гистологическим типом достоверно повышена только концентрация VEGF. По результатам 4-летнего наблюдения общая выживаемость больных с концентрацией VEGF в опухоли, превышающей медианный уровень 7,3 пг/мг белка, достоверно выше, чем у больных с более низким уровнем VEGF в опухоли (соответственно 94 и 80%); экспрессия компонентов системы активации плазминогена достоверно не влияет на выживаемость больных раком эндометрия.

Ключевые слова: *uPA, PAI-1, tPA, VEGF, рак эндометрия, прогноз*

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND COMPONENTS OF PLASMINOGEN ACTIVATION SYSTEM IN ENDOMETRIAL CANCER: CLINICO-MORPHOLOGICAL CORRELATIONS

E.S. Gershtein, E.V. Gritsaenko, I.V. Tereshkina, N.A. Ognerubov, N.E. Kushlinskii

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

The content of VEGF and some components of plasminogen activation system (uPA, PAI-1 and tPA) was determined by enzyme immunoassay methods in the tumors from 121 endometrial cancer patients and in 18 samples of endometrial hyperplasia. Concentrations of uPA and PAI-1 in cancer tissue were significantly higher than in endometrial hyperplasia. Statistically significant positive association was observed between uPA and VEGF, uPA and PAI-1, PAI-1 and VEGF concentrations, and negative correlation existed both between tPA and uPA, and between tPA and VEGF in endometrial cancer. Pronounced association with traditional prognostic factors was found for PAI-1 and VEGF: the concentrations of these proteins increased along with disease progression (FIGO stage, depth of myometrial invasion), dedifferentiation, and the loss of tumor hormone sensitivity. Higher uPA expression was associated only with the increase of myometrial invasion, and unfavorable histologic sub-types of endometrial carcinoma were characterized only by increased VEGF expression if compared to histologically favorable group. 4-years monitoring revealed that overall survival rate in patients with tumor VEGF concentration exceeding median level – 7,3 pg/mg protein is significantly higher than in those with lower tumor VEGF level (94% and 81% respectively); levels of expression of plasminogen activation system components did not significantly affect endometrial cancer patients' survival rate.

Key words: *uPA, PAI-1, tPA, VEGF, endometrial cancer, prognosis*

Несмотря на относительно благоприятное клиническое течение и удовлетворительный прогноз при раке тела матки, рост заболеваемости, наблюдающийся в последние годы как в нашей стране, так и за рубежом, требует разработки новых подходов к прогнозированию исхода болезни и индивидуализации при выборе послеоперационного лечения. В этой связи не теряет актуальности изучение биологических маркеров, характеризующих фундаментальные свойства опухоли – такие, как способность к мета-

стазированию и инвазии, пролиферативная активность, чувствительность к эндогенным и экзогенным регуляторам.

Большое внимание в онкологии уделяется проблеме ангиогенеза – образования новых капиллярных отростков из уже существующих крупных сосудов, поскольку опухоль не может развиваться и расти без образования в ней разветвленной сети кровоснабжения, обеспечивающей поступление в клетки кислорода и питательных веществ. Изучение молекулярных механизмов ангиогенеза привело к обнаружению большой группы регуляторных ангиогенных и антиангиогенных факторов, динамический баланс которых обеспечивает формирование и распространение новых сосудов в опухоли и контролирует их рост в нормальных физиологических условиях [2, 15, 16].

Одним из важнейших положительных регуляторов неоваскуляризации является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor – VEGF), стимулирующий пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [2]. Существенную роль в процессах неоангиогенеза играет также протеолитический каскад активации плазминогена: с одной стороны, экспрессия важнейших компонентов этого каскада индуцируется под действием VEGF, с другой – их протеолитическое воздействие на компоненты внеклеточного матрикса способствует распространению образующихся новых сосудов [6]. Кроме того, хорошо известны важная роль системы активации плазминогена в регуляции метастазирования и инвазии злокачественных опухолей и прогностическое значение некоторых компонентов этой системы при различных онкологических заболеваниях [3, 7].

Исследования последних лет позволили по-новому взглянуть и на процессы ангиогенеза в репродуктивной системе женщин как при физиологических изменениях [8, 15, 18, 20], так и при различных патологических состояниях, в частности, при раке эндометрия [12, 16]. Показана роль ангиогенных факторов и их рецепторов в процессе васкуляризации опухолевой ткани, взаимосвязь экспрессии VEGF и его рецепторов с прогнозом заболевания и эффективностью лечения [5, 10, 13, 17], намечены новые направления терапевтических воздействий на злокачественный процесс, в том числе связанные с подавлением активации плазминогена [9, 14]. Продемонстрированы также усиление экспрессии отдельных компонентов системы активации плазминогена (активатора урокиназного типа – uPA, ингибитора PAI-1) при раке эндометрия [4, 19], их участие в неоангиогенезе в этой ткани [21] и прогностическое значение при ранних стадиях заболевания [11, 22]. Дальнейшее изучение белков-регуляторов ангиогенеза и инвазии при раке эндометрия позволит уточнить патогенез указанных нарушений и разработать методы специфической коррекции.

Все сказанное определило цель настоящего исследования: оценить соотношение экспрессии VEGF и компонентов системы активации плазминогена в раковой ткани и при доброкачественных новообразованиях эндометрия и взаимосвязь этих показателей с клинико-морфологическими особенностями рака тела матки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 121 больная раком эндометрия в возрасте от 40 до 62 лет (медиана – 60,6 года) и 18 женщин с гиперплазией эндометрия различной степени тяжести (средний возраст – 44,4 года). У 100 больных раком эндометрия была менопауза продолжительностью от 1 года до 27 лет, 17 больных были в состоянии перименопаузы и у 4 пациенток была сохранена менструальная функция. Женщины с гиперплазией находились преимущественно в климактерическом периоде (12), у 5 была сохранена менструальная функция и у 1 больной была менопауза в течение 3 лет. В соответствии с классификацией FIGO, у 54% больных раком эндометрия была Iб стадия заболевания, у 21,5% – IIа, у 16% – Iа стадия, у 6% – IIIа стадия; остальные стадии были представлены единичными наблюдениями. У всех пациентов клинический диагноз был подтвержден данными гистологического исследования.

Все больные на 1-м этапе получили хирургическое лечение. Преобладающим объемом оперативного вмешательства была экстирпация матки с придатками. Применялись также различные виды комбинированного и комплексного лечения. Только операция в объеме простой экстирпации матки с придатками выполнена 48 (39,7%) пациенткам. Гормонотерапия 17-оксипрогестеронкапронатом проведена 5 (4,1%) больным с высоким риском рецидива рака эндометрия, которые по тем или иным причинам (ожирение III–IV степени, тяжелая соматическая патология) имели противопоказания к лучевому лечению. Комбинированный метод лечения (операция и лучевая терапия) использован у 59 (48,8%) больных. Комплексное лечение, включающее оперативное вмешательство с последующим применением лучевого метода лечения и курсов химиотерапии, проведено 9 (7,4%) больным.

Участки опухоли массой 400–500 мг, полученные во время операции, доставляли на льду в лабораторию и хранили при -70°С до начала исследования. Концентрацию исследуемых маркеров определяли в высокоскоростных цитозолях [1, 3]. Определение свободного VEGF проводили с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа «CytElisa™ Human VEGF» (Cytimmune Science Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя; uPA, PAI-1 и tPA определяли с помощью наборов реактивов для иммуноферментного анализа, разработанных в Католическом университете Наймегена (Нидерлан-

ды), как описано ранее [3]. Измерения проводили на автоматическом универсальном ридере для микропланшет EL×800 фирмы Bio-Tek Instruments, Inc. (США). Концентрацию анализируемых компонентов системы активации плазминогена выражали в нг/мг цитозольного белка, концентрацию VEGF – в пг/мг белка. Белок определяли по методу Лоури.

Во всех образцах конкурентным радиолигандным методом определяли содержание рецепторов эстрогенов (РЭ) и рецепторов прогестерона (РП). Опухоли считали положительными по РЭ при концентрации рецепторов не менее 10 фмоль/мг белка, по РП – при концентрации не менее 20 фмоль/мг белка.

При сравнении показателей использовали непараметрические критерии: Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, медианный тест, тест корреляции рангов Спирмена (R). Выживаемость пациентов оценивали методом Каплана–Мейера, при сравнении кривых использовали F-тест Кокса. Все различия и корреляции считали достоверными при $p<0,05$. Статистическая обработка данных осуществлена с помощью программного пакета Statistica 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сравнительного анализа содержания VEGF и компонентов системы активации плазминогена в раковых тканях и при гиперплазированном эндометрии представлены в табл. 1. В цитозолях всех изученных образцов обнаружены измеримые количества VEGF. Достоверных различий концентрации VEGF между 2 группами не обнаружено. Концентрация tPA в злокачественных и доброкачественных тканях эндометрия также была практически одинаковой и довольно низкой по сравнению с таковой в других неизмененных тканях и при доброкачественных опухолях [3]. В то же время концентрация uPA и PAI-1 в ткани рака эндометрия была достоверно выше, чем в гиперплазированном эндометрии.

В ткани рака эндометрия наблюдалась статистически значимая положительная корреляционная связь между следующими показателями: uPA и VEGF ($R=0,51$; $p<0,05$), uPA и PAI-1 ($R=0,50$; $p<0,00001$), PAI-1 и VEGF ($R=0,48$; $p<0,05$). Наличие таких взаимосвязей косвенно подтверждает роль uPA и PAI-1 в VEGF-зависимом ангиогенезе в эндометрии. Между концентрацией tPA и uPA, а также tPA и VEGF наблюдалась отрицательная корреляция ($R=-0,58$; $p<0,00001$ и $R=-0,38$; $p<0,01$, соответственно). В то же время в гиперплазированном эндометрии достоверных корреляционных связей между изученными показателями не обнаружено, что может указывать на независимую экспрессию этих белков при доброкачественных изменениях эндометрия.

Выраженной зависимости экспрессии изучаемых белков в опухолевой ткани от менопаузного статуса больных раком эндометрия не обнаружено (табл. 2). Возможно, это объясняется тем, что у большинства (83%) больных была менопауза. Можно отметить, однако, что концентрация uPA и PAI-1 в опухоли слабоположительно коррелировала с возрастом пациентов (соответственно $R=0,18$; $p<0,05$ и $R=0,27$; $p<0,001$).

При анализе зависимости концентрации изучаемых показателей от стадии рака эндометрия обнаружено, что концентрации PAI-1 и VEGF достоверно увеличивается при более поздних стадиях; аналогичная тенденция отмечена и для uPA (табл. 2). Уровень PAI-1, кроме того, достоверно положительно коррелировал со стадией заболевания по тесту Спирмена ($R=0,37$; $p<0,0001$). Следует отметить, что при I стадии рака эндометрия ни один из исследованных показателей достоверно не отличался от таковых при гиперплазии эндометрия. Таким образом, биохимические показатели инвазивной и ангиогенной активности рака эндометрия существенно возрастают по сравнению с доброкачественными пролиферативными изменениями только при достаточно распространенном процессе.

Один из наиболее важных прогностических признаков при раке эндометрия – глубина инвазии опухоли в миометрий. По этому показателю больные были разделены на 4 подгруппы (см. табл. 2): 1 – опухоль расположена в пределах эндометрия; 2 – глубина инвазии до 5 мм; 3 –глубина инвазии 5–10 мм; 4 – глубина инвазии >1 см. С увеличением глубины инвазии концентрация PAI-1, uPA и VEGF достоверно возрастала, а концентрация tPA практически не изменялась. Концентрации PAI-1 и uPA также достоверно положительно коррелировали с глубиной инвазии по тесту Спирмена (соответственно $R=0,30$; $p<0,01$ и $R=0,23$; $p<0,05$).

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА (НГ/МГ БЕЛКА) И VEGF (ПГ/МГ БЕЛКА) В ТКАНИ РАКА И ГИПЕРПЛАЗИРОВАННОГО ЭНДОМЕТРИЯ

Исследованный материал	Число больных	Медиана (25–75%)			
		uPA	PAI-1	tPA	VEGF
Рак эндометрия	121	0,26* (0,13–0,46)	0,14* (0,06–0,76)	0,40 (0,04–0,43)	7,3 (3,5–28,8)
Гиперплазия эндометрия	18	0,16 (0,10–0,26)	0,05 (0–0,11)	0,47 (0,18–0,89)	6,45 (2,70–9,00)

Примечание. * – различия с гиперплазией статистически значимы ($p<0,05$; тест Манна–Уитни).

Концентрация PAI-1 была достоверно повышена также в умеренно дифференцированных карциномах эндометрия (G2) по сравнению с высокодифференцированными (G1) (см. табл. 2). В целом отмечена достоверная положительная корреляция экспрессии PAI-1 со степенью дифференцировки (R=0,26; p<0,001). Достоверной взаимосвязи других изученных показателей со степенью дифференцировки рака эндометрия не выявлено. Однако при разделении больных по гистологическому типу опухоли на подгруппы с благоприятным (аденокарцинома, аденоакантома) и неблагоприятным (светлоклеточный и недифференцированный рак, аденоплоскоклеточная карцинома) прогнозом оказалось, что в опухолях больных из прогностически неблагоприятной группы достоверно повышена концентрация VEGF и uPA (см. табл. 2).

Еще одной важной характеристикой рака эндометрия является рецепторный статус опухоли, во многом определяющий ее гормоночувствительность. Все рецепторотрицательные опухоли характеризовались более высоким содержанием VEGF, PAI-1 и uPA и более низким содержанием tPA, чем рецепторположительные, однако различия были достоверны только для VEGF в зависимости от статуса РЭ (p<0,05) и для PAI-1 в зависимости от статуса РП (p<0,05) (см. табл. 2). Такая закономерность соответствует известному положению о меньшей дифференцированности рецепторотрицательных (особенно по РП) опухолей эндометрия, чем рецепторположительных. С другой стороны, учитывая, что в неизмененном эндометрии синтез VEGF индуцируется эстрадиолом [12, 18], можно предположить, что при малигнизации этой ткани

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ UPA, TPA, PAI-1 (НГ/МГ БЕЛКА) И VEGF (ПГ/МГ БЕЛКА) В ТКАНИ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Характеристика	Число больных	Медиана (25–75%)			
		uPA	tPA	PAI-1	VEGF
Менопаузный статус:					
менструирующие	4	0,27 (0,18–0,49)	0,08 (0–0,47)	0,06 (0–0,40)	11,0 (8,0–21,3)
перименопауза	17	0,16 (0,12–0,23)	0,45 (0,22–0,91)	0,06 (0,01–0,19)	6,3 (2,6–23,6)
постменопауза	100	0,29 (0,13–0,51)	0,35 (0,01–0,76)	0,16 (0,05–0,35)	7,0 (3,6–26,1)
p		<0,05**	HS	HS	HS
Стадия					
I	86	0,24 (0,13–0,43)	0,41 (0,08–0,86)	0,10 (0,02–0,26)	5,8 (3,5–17,7)
II	26	0,34 (0,14–0,68)	0,26 (0,05–0,74)	0,19 (0,05–0,44)	15,7 (3,7–33,7)
III	8	0,42 (0,22–2,93)	0,08 (0,05–0,51)	0,76 (0,51–1,68)	32,2 (6,2–87,3)
p		HS	HS	<0,0001*	<0,05*
G					
G1	39	0,18 (0,12–0,34)	0,30 (0,04–0,51)	0,07 (0–0,27)	7,4 (3,1–17,7)
G2	47	0,27 (0,12–0,53)	0,46 (0,22–0,77)	0,19 (0,08–0,45)	8,0 (3,8–26,4)
G3	15	0,30 (0,18–0,61)	0,30 (0,08–0,51)	0,15 (0,09–0,46)	4,7 (3,1–24,0)
p		HS	HS	<0,05*	HS
Глубина инвазии, мм, *in situ*:					
<5	19	0,23 (0,13–0,34)	0,29 (0,04–0,49)	0,08 (0–0,26)	11,0 (4,6–21,2)
5–10	34	0,20 (0,12–0,47)	0,40 (0,26–1,00)	0,09 (0,02–0,23)	5,0 (3,4–12,4)
>10	59	0,30 (0,13–0,48)	0,48 (0,06–0,75)	0,19 (0,07–0,36)	7,4 (3,5–26,4)
	5	0,95 (0,68–0,97)	0,06	0,64 (0,37–1,21)	33,4 (5,6–54,9)
p		<0,001*	HS	<0,05*	<0,05*
Гистологический тип опухоли:					
благоприятный	95	0,24 (0,13–0,47)	0,30 (0,05–0,75)	0,14 (0,05–0,31)	5,9 (3,4–19,1)
неблагоприятный	12	0,42 (0,28–0,90)	0,30 (0,06–0,51)	0,26 (0,10–0,42)	23,8 (7,6–39,2)
p		HS	HS	HS	<0,05***
Статус РЭ					
+	91	0,25 (0,13–0,44)	0,44 (0,10–0,77)	0,13 (0,03–0,27)	5,8 (3,5–17,7)
–	30	0,32 (0,12–0,97)	0,30 (0,02–0,47)	0,23 (0,04–0,71)	18,3 (4,5–45,0)
p		HS	HS	HS	<0,05***
Статус РП					
+	84	0,23 (0,13–0,42)	0,46 (0,08–0,77)	0,10 (0,01–0,27)	6,3 (3,5–21,2)
–	37	0,33 (0,11–0,87)	0,23 (0,05–0,74)	0,19 (0,01–0,49)	7,6 (3,7–33,4)
p		HS	HS	<0,05***	HS

Примечание. Звездочки – различия между группами статистически значимы: * – тест Краскела–Уоллиса; ** – медианный тест; *** – тест Манна–Уитни; HS – различия недостоверны.

гормональный контроль ангиогенеза ослабляется или утрачивается. Интересно, что в гиперплазированном эндометрии отмечается высокодостоверная отрицательная корреляционная связь концентраций VEGF и РП в цитозолях (R=-0,71; p=0,001), а взаимосвязь экспрессии VEGF и РЭ полностью отсутствует (R=0,05). По-видимому, механизмы гормональной регуляции ангиогенеза в малигнизированной и доброкачественно измененной ткани эндометрия различны. Однако подобные различия могут быть связаны и с тем, что большинство больных раком эндометрия были в менопаузе, а женщины с гиперплазией находились в репродуктивном возрасте либо в климактерическом периоде.

Пациенты были прослежены в течение 9–50 мес после операции. За время наблюдения от прогрессирования основного заболевания умерли 16 (13%) больных раком эндометрия, которые прожили от 9 до 33 мес (медиана – 21 мес). При построении кривых выживаемости с использованием метода Каплана–Мейера пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от содержания VEGF в опухоли. За основу деления взята медиана концентрации этого фактора роста, которая составила 7,3 пг/мг белка. Общая выживаемость пациенток с низким уровнем VEGF в опухоли оказалась достоверно ниже, чем у пациенток с высоким уровнем маркера: 4-летняя выживаемость составила соответственно 81 и 94% (см. рисунок; p=0,02). Медиана выживаемости за время наблюдения не была достигнута ни в одной из подгрупп. Таким образом, низкая экспрессия VEGF, вопреки ожиданиям, не улучшала показатель общей выживаемости.

Больные были также разделены на подгруппы в зависимости от содержания компонентов системы активации плазминогена (uPA, PAI-1 и tPA) в раковой ткани эндометрия. Во всех случаях за основу деления принимали медиану концентрации соответствующего белка.

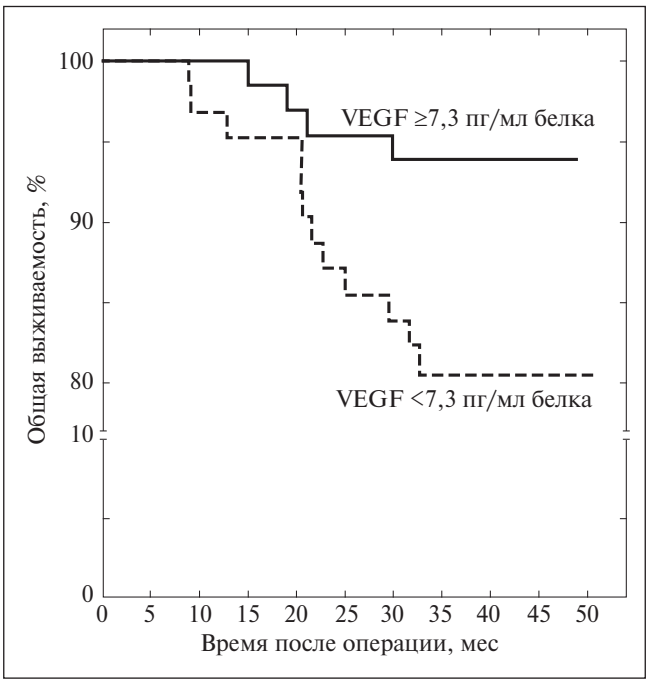
Для uPA эта величина составила 0,26 нг/мг белка. В группу с высоким уровнем uPA вошли 60 больных, из которых 7 умерли за время наблюдения; в группу с низким уровнем uPA – 61 пациентка, из них 9 умерли. Достоверных различий в общей выживаемости между этими группами не обнаружено.

Для PAI-1 условной границей для разделения больных на группы была концентрация 0,14 нг/мг белка. В группу с высоким уровнем этого ингибитора вошло 60 больных, из которых 10 умерли за время наблюдения; в группу с низким уровнем PAI-1 – 61 пациентка, из них 6 умерли. Достоверных различий общей выживаемости между этими 2 группами также не обнаружено, хотя наблюдалась выраженная тенденция к ухудшению выживаемости при высоком уровне PAI-1 в раковой ткани эндометрия: 4-летняя выживаемость в группе с высоким содержанием PAI-1 составила 84%, с низким – 90%. Не выявлено и достоверных различий в выживаемости больных раком эндометрия в зависимости от содержания tPA в опухоли, а также при разделении больных на группы с использованием в качестве пограничных значений показателей верхних квартилей концентраций соответствующих белков (VEGF – 25,8 пг/мг; uPA – 0,46 нг/мг; PAI-1 – 0,43 нг/мг и tPA – 0,76 нг/мг белка).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, рак эндометрия, как и многие другие злокачественные новообразования [3], характеризуется значительным усилением активации плазминогена по урокиназному типу с параллельным увеличением концентрации PAI-1, защищающего опухолевые клетки от саморазрушения. Отсутствие достоверного увеличения концентрации VEGF в ткани рака эндометрия по сравнению с гиперплазией может быть связано с высокой степенью васкуляризации эндометрия даже в нормальных физиологических условиях и с возрастными отличиями 2 групп пациенток. Тем не менее уровень экспрессии uPA и PAI-1 в ткани рака эндометрия был тем выше, чем больше в ней содержалось VEGF, что может свидетельствовать о взаимосвязи активации протеолитических процессов и неоангиогенеза.

Выраженная взаимосвязь с традиционными факторами прогноза рака эндометрия обнаружена только для PAI-1 и в несколько меньшей степени – для VEGF: концентрация этих белков возрастает при увеличении распространенности процесса (стадия



Общая выживаемость больных раком эндометрия в зависимости от уровня VEGF в опухоли

FIGO, глубина инвазии в миометрий), при уменьшении степени дифференцировки и при утрате гормоночувствительности. Уровень uPA связан только с глубиной инвазии, что соответствует ключевой роли этой протеазы в процессах местного распространения злокачественных опухолей. В то же время в опухолях эндометрия с неблагоприятным гистологическим типом достоверно повышена только концентрация VEGF.

В отличие от других тканей, в эндометрии уровень экспрессии tPA практически не меняется при переходе от доброкачественных процессов к злокачественным или в зависимости от клинико-морфологических характеристик рака. По-видимому, активация плазминогена по тканевому типу при раке эндометрия не играет той роли, которая отводится ей при других злокачественных новообразованиях.

Таким образом, нам удалось продемонстрировать, что при раке эндометрия происходят достоверные и взаимосвязанные изменения экспрессии некоторых компонентов системы активации плазминогена и фактора роста эндотелия сосудов, наиболее выраженные при распространенном процессе и в малодифференцированных и гормонорезистентных опухолях. Кроме того, установлено, что из всех изученных показателей определенное значение для прогноза выживаемости больных раком эндометрия имел только VEGF, причем высокий уровень этого белка в опухоли соответствует более благоприятному течению заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герштейн Е.С., Грицаенко Е.В., Щербаков М.Е. и др. Фактор роста эндотелия сосудов и компоненты системы активации плазминогена при раке и гиперплазии эндометрия // Вопросы онкологии. – 2003; 49 (6): 725–29.
2. Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Дегтярь В.Г. Фактор роста эндотелия сосудов как основной регулятор ангиогенеза и клинически значимый показатель при различных злокачественных новообразованиях // Технологии живых систем. – 2013; 2: 18–33.
3. Герштейн Е.С., Талаева Ш.Ж., Сандыбаев М.Н., Кушлинский Н.Е. Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека. // Молекулярная медицина. – 2007; 1: 4–8.
4. Dariusz S., Agnieszka M., Elzbieta R. et al. A potency of plasminogen activation system in long-term prognosis of endometrial cancer: a pilot study // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2012; 163 (2): 193–9.
5. de Gois Speck N., Focchi J., Alves A. et al. Relationship between angiogenesis and grade of histologic differentiation in endometrial adenocarcinoma // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2005; 26 (6): 599–601.
6. Duffy M. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy // Curr. Pharm. Des. – 2004; 10 (1): 39–49.
7. Duffy M., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer // Clin. Biochem. – 2004; 37 (7): 541–8.
8. Dunk C., Smith S., Hazan A. et al. Promotion of angiogenesis by human endometrial lymphocytes // Immunol. Invest. – 2008; 37 (5): 583–610.
9. Ertongur S., Lang S., Mack B. et al. Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system // Int. J. Cancer. – 2004; 110 (6): 815–24.
10. Fine B., Valente P., Feinstein G. et al. VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma // Gynecol. Oncol. – 2000; 76 (1): 33–9.
11. Fredstorp-Lidebring M., Bendahl P., Brunner N. et al. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, in association with progression-free survival in early stage endometrial cancer // Eur. J. Cancer. – 2001; 37 (18): 2339–48.
12. Fujimoto J., Toyoki H., Jahan I. et al. Sex steroid-dependent angiogenesis in uterine endometrial cancers // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2005; 93 (2–5): 161–5.
13. Fujisawa T., Watanabe J., Akaboshi M. et al. Immunohistochemical study on VEGF expression in endometrial carcinoma--comparison with p53 expression, angiogenesis, and tumor histologic grade // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2001; 127 (11): 668–74.
14. Giatromanolaki A., Sivridis E., Brekken R. et al. The angiogenic «vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR) receptor» pathway in patients with endometrial carcinoma: prognostic and therapeutic implications // Cancer. – 2001; 92 (10): 2569–77.
15. Girling J., Rogers P. Recent advances in endometrial angiogenesis research // Angiogenesis. – 2005; 8 (2): 89–99.
16. Horree N., van Diest P., van der Groep P. et al. Hypoxia and angiogenesis in endometrioid endometrial carcinogenesis // Cell. Oncol. – 2007; 29 (3): 219–27.
17. Kamat A., Merritt W., Coffey D. et al. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer // Clin. Cancer Res. – 2007; 13 (24): 7487–95.
18. Maas J., Groothuis P., Dunselman G. et al. Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle // Hum. Reprod. – 2001; 16 (8): 1557–61.
19. Memarzadeh S., Kozak K., Chang L. et al. Urokinase plasminogen activator receptor: Prognostic biomarker for endometrial cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002; 99 (16): 10647–52.
20. Rogers P., Donoghue J., Walter L. et al. Endometrial angiogenesis, vascular maturation, and lymphangiogenesis // Reprod. Sci. – 2009; 16 (2): 147–51.
21. Sandberg T., Ehinger A., Casslen B. Paracrine stimulation of capillary endothelial cell migration by endometrial tissue involves epidermal growth factor and is mediated via up-regulation of the urokinase plasminogen activator receptor // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001; 86 (4): 1724–30.
22. Taponeco F., Curcio C., Giuntini A. et al. Expression and prognostic significance of urokinase and plasminogen activator inhibitor type-1 in endometrial hyperplasia and cancer // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2001; 20 (2): 239–46.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.146-006-091.8-037

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ПОЛОВЫХ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ОПУХОЛЯХ ЭНДОМЕТРИЯ

Р.Р. Ажигова[1], **О.М. Кузнецова**[1], кандидат медицинских наук, доцент, **Д.Э. Галдава**[2], **Е.К. Дворова**[2], **К.П. Лактионов**[2], доктор медицинских наук, профессор, **Т.Т. Березов**[1], академик РАМН, профессор

[1]Российский университет дружбы народов,

[2]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

E-mail: olya.k@mail.ru

Представлены данные, полученные при изучении рецепторов эпидермального фактора роста (РЭФР), эстрогенов (РЭ), прогестерона (РП) в опухолях эндометрия у 125 больных. РЭФР выявлены в 40% опухолей. Наиболее часто выявляли РЭФР$^-$РЭ$^+$РП$^+$-опухоли (48,8%), реже – РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$ (30,4%). Частота выявления РЭФР в опухоли более информативна, чем его уровень у больных раком эндометрия. Она снижалась при неблагоприятных клинических и морфологических признаках заболевания. Обсуждается связь экспрессии РЭФР, РЭ и РП с прогнозом рака эндометрия.

Ключевые слова: *рак эндометрия, РЭФР, РЭ, РП, прогноз*

CLINICAL SIGNIFICANCE OF EPIDERMAL GROWTH FACTORS AND SEX STEROIDS IN ENDOMETRIAL TUMORS

R.R. Azhigova[1], O.M. Kuznetsova[1], D.E. Galdava[2], E.K. Dvorova[2], K.P. Laktionov[2], T.T. Berezov[1]

[1]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

[2]N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

The study data of the epidermal growth factor receptors(EGFR), estrogen and progesterone receptors(ER, PR) in the endometrial tumors in 125 patients are presented. EGFR have been detected in 40% of tumors. The EGFR$^-$RP$^+$ER$^+$ tumors were detected most frequently (48,8%) and EGFR$^+$ER$^+$PR$^+$ (30,4%) were identified less often. The frequency of detection of EGFR in the tumor being more informative than its level in patients with endometrial cancer decreased in cases of unfavorable clinical and morphological characteristics of the disease. The relationship between the expression of EGFR, ER and PR with a prognosis of endometrial cancer is discussed

Key words: *endometrial cancer, EGFR, ER, PR, prognosis*

В мире ежегодно число вновь выявленных больных раком тела матки (188 800) превышает число умерших. В России ежегодно регистрируется более 17 тыс. случаев рака тела матки; в 2005 г. в России он занимал 3-е место [1]. Прогноз заболевания относительно благоприятный; в большинстве случаев заболевание диагностируют в I–II стадиях, когда возможно радикальное хирургическое удаление опухоли. Показатели 5-летней выживаемости при локализованном, местнораспространенном и метастатическом раке составляют соответственно 96, 65 и 26% [13]. Однако несмотря на то, что рак эндометрия обычно распознают на ранних стадиях, в США, например, смертность от него выше, чем от рака шейки матки [4]. О высоком риске развития рецидива заболевания свидетельствуют низкая степень дифференцировки опухоли, ее инвазия в миометрий, наличие метастазов в придатках или тазовых органах, распространение опухоли за пределы дна тела матки, а также наличие опухолевых эмболов в просвете лимфатических сосудов [18].

Этиология рака эндометрия, как и большинства опухолей, неизвестна, патогенез изучен не до конца. Вместе с тем рак тела матки считают гормональнозависимой опухолью [2, 17, 18]. В последнее десятилетие активно изучают в опухолях эндометрия молекулярно-биологические маркеры, которые характеризуют их «биологическое поведение», лекарственную и гормональную чувствительность, способность к инвазии и метастазированию [5]. Особое внимание уделяют так называемому рецепторному фенотипу рака эндометрия, а именно анализу рецепторов эпидермального фактора роста (РЭФР), эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП) в первичных опухолях [2, 7]. Известно, что начальным этапом механизма действия многих цитокинов является их

связывание со специфическим рецептором-белком нормальной и опухольтрансформированной клетки. Недостаточная экспрессия рецепторов, нарушение их структуры и функции приводят к резистентности опухолевых клеток к митогенактивированной активности лигандов, а стало быть, и неэффективности применяемых методов лекарственной терапии [3]. Все это также отражается на прогнозе заболеваний, в том числе онкологических.

Ранее проведенные клинические исследования показали, что уровень и соотношение экспрессии РЭФР, РЭ и РП в опухоли могут служить показателем ее метастатической и инвазивной активности, а также биологически значимым фактором прогноза при ряде новообразований, в том числе и рака тела матки [3, 7, 9, 10]. При этом основополагающие исследования по изучению роли указанных выше рецепторов были выполнены при раке молочной железы и свидетельствуют о том, что изучение этих рецепторов весьма перспективно с клинической точки зрения, так как они позволяют предсказывать прогноз заболевания [2, 6, 8, 12, 14, 16].

Целью настоящего исследования были сравнительное изучение частоты выявления и содержания РЭФР, РЭ, РП в опухолях больных раком эндометрия и оценка их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании участвовали 125 больных раком эндометрия в разных стадиях опухолевого процесса, в возрасте от 35 до 75 лет (средний возраст 58,1 0,6 года). У всех больных диагноз рак эндометрия подтвержден данными гистологического исследования опухоли, согласно Международной классификации опухолей человека (ВОЗ, 2003).

Концентрацию РЭФР определяли в гомогенатах опухолей эндометрия. Кусочки тканей опухоли массой 300–500 мг после операции доставляли на льду в лабораторию и подвергали гомогенизации либо хранили в течение 1–30 дней при температуре -70°С. Перед гомогенизацией ткань тщательно очищали от участков жира и некроза, взвешивали и растирали в жидком азоте. Полученный порошок переносили в центрифужные пробирки, предварительно помещенные в ледяную баню, и добавляли TED-буфер (10 мМ трис-HCl, 1,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотрейтол; pH 7,4), содержащий 10% глицерина (по объему), из расчета 1 мл буфера на 100 мг ткани. Тщательно перемешивали гомогенат и центрифугировали в течение 30 мин при 105 000 об/мин и температуре 4°С (центрифуга Optima TM TLC, «Beckman», США).

Осадок, полученный после центрифугирования, регомогенизировали в 1 мл буфера А (0,25 мМ K,Na-PBS, 70 мг/л бацитрацина, 1 г/л бычьего сывороточного альбумина) и центрифугировали еще раз в течение 10 мин при 2000 об/мин и 4°С на той же центрифуге. Надосадочную фракцию, представляющую собой грубую мембранную суспензию, замораживали в жидком азоте, хранили при температуре -70°С, а затем использовали для определения РЭФР.

Содержание РЭФР в мембранной фракции опухолей и неизмененных тканях эндометрия проводили модифицированным радиолигандным методом [9]. В качестве меченого лиганда использовали мышиный ЭФР (receptor grade; фирма «Sigma», США), йодированный с помощью ^{125}I-Na в присутствии хлорамина Т (удельная радиоактивность 45–120 Ки/ммоль). Суспензию мембран (0,1 мл; концентрация белка – 0,2–1 мг/мл) инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (20–25°С) с 3,5 нМ ^{125}I-ЭФР в присутствии и в отсутствие 200-кратного избытка немеченого ЭФР («Sigma», США), периодически встряхивая в миксере. По окончании инкубации пробирки помещали в ледяную баню и осаждали лигандрецепторный комплекс охлажденной суспензией гидроксилапатита (Sigma; DNA-grade) в PBS-буфере (2:1 по объему). После дополнительной инкубации при 0–4°С в течение 30 мин добавляли к пробам по 0,5 мл PBS и центрифугировали 3–5 мин при 2000 об/мин при температуре 4°С (центрифуга РС-6), надосадочную жидкость удаляли, затем трижды промывали осадок гидроксилапатита 1 мл PBS. Просчитывали радиоактивность осадка на гамма-счетчике (фирма «LKB», Швеция) и вычисляли количество специфически связанного ^{125}I-ЭФР по разнице между общим (в отсутствии конкурента) и неспецифическим (в присутствии избытка немеченого лиганда) связыванием. Количество РЭФР выражали в фмоль/мг мембранного белка. Пробы считали рецепторположительными при содержании РЭФР не менее 5 фмоль/мг белка.

Концентрацию РЭ и РП определяли декстран-угольным методом по связывающей способности цитоплазматических белков-рецепторов по отношению к ^{3}H-ORG-2058 и ^{3}H-Э$_2$ в цитозольной фракции опухолей эндометрия. Образцы опухоли эндометрия массой от 200 до 500 мг измельчали в фарфоровой ступке при охлаждении жидким азотом. Смешивали с буфером. Состав буфера: 10 ммоль/л Трис-HCl («E.Merck», Германия), 1,5 ммоль/л ЭДТА («Sigma», США), 1 ммоль/л дитиотрейтола («Koch-Light Laboratories», Великобритания), 0,03% азида натрия («E.Merck», Германия), pH 7,4 при 20°С, 10% глицерин марки «осч» (по объему). После размораживания смесь центрифугировали 10 мин при 2500–3000 об/мин. Из надосадочной жидкости получали цитозоль, центрифугируя пробы при 105 000 об/мин в течение 1 ч (ротор АН-650, центрифуга модели «Sorvall, FRC-1» фирма «Du Pont Instruments», Великобритания). Для работы использовали цитозоль с концентрацией общего белка около 1,0 мг/мл.

Инкубацию проб цитозоля с ^{3}H-стероидами проводили в течение 12–14 ч при 0–4°С. Пробы 100 мкл цитозоля инкубировали с радиоактивными лигандами ^{3}H-ORG-2058 или с ^{3}H-Э$_2$. Чистота используемых лигандов была не менее 98%. Специфическое связывание цитоплазматических белков-рецепторов со стероидами определяли при насыщающей концентрации радиоактивного лиганда – 10 нМ с учетом неспецифического связывания в присутствии 100-кратного избытка ORG-2058 («Amersham», Великобритания) для прогестерона и диэтилстильбестрола («Calbiochem», США) – для эстрогенов. Для разделения связанного и свободного стероида пробы обрабатывали углем, активированным декстраном Т70. В надосадочной жидкости определяли радиоактивность на спектрометре модели MARK 3S (фирма «Tracor Europa», Голландия). Эффективность счета по тритию составляла около 40%.

При анализе полученных результатов применяли одно- и многофакторный дисперсионный анализ. Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью стандартного пакета статистических программ. При выборе статистических процедур учитывали методологические требования Международного конгресса по гармонизации GCP «Статистические принципы для клинических исследований».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РЭФР выявлены у 40%, РЭ – у 87,2%, РП – у 80,8% больных раком эндометрия. Не отмечено связи между частотой обнаружения РЭФР$^+$ и рецепторами стероидных гормонов (РЭ$^+$ и РП$^+$). Так, в РЭФР$^-$- и РЭФР$^+$-опухолях РЭ$^+$ выявлены соответственно в 85,3 и 90,0%, а РП$^+$ – в 81,3 и 80,0% случаев. В то же время частота обнаружения РЭ и РП в опухоли больных раком эндометрия была достоверно связана между собой (p=0,0001).

Наиболее часто выявляли РЭФР$^-$РЭ$^+$РП$^+$-опухоли (48,8%), реже – РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$ (30,4%). Опухоли эндометрия с другим сочетанием рецепторов обнаруживали значительно реже: РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$ – в 8,8%, РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^-$ – в 5,6%, РЭФР$^-$РЭ$^+$РП$^-$ – в 2,4%, РЭФР$^+$РЭ$^-$РП$^+$ – в 2,4%, РЭФР$^+$РЭ$^-$РП$^-$ – в 1,6% случаев.

Распределение содержания РЭФР$^+$ в опухолях 50 больных раком эндометрия достоверно отличалось от такового в норме, поэтому для его оценки применяли медиану, а для сравнения – непараметрические критерии. Значения РЭФР$^+$ колебались в широких пределах – от 10 до 310 (медиана – 93,0) фмоль/мг белка; РЭ – от 11 до 684 (медиана 66) фмоль/мг белка; РП – от 21 до 1880 (медиана 253) фмоль/мг белка.

Дополнительно больных раком эндометрия разделили на группы с учетом содержания РЭФР в опухоли: 1-я группа – РЭФР$^-$, 2-я – концентрация РЭФР$^+$<93 фмоль/мг белка, 3-я – концентрация РЭФР$^+$>93 фмоль/мг белка. По такому же принципу были выделены 3 группы с учетом концентрации РЭ и РП.

Отмечена тенденция к снижению частоты выявления и уровня РЭФР у больных раком эндометрия в возрасте старше 70 лет и не обнаружено корреляционной связи показателей возраста пациенток с рецепторным статусом (РЭФР, РЭ, РП) опухоли.

Содержание РЭФР$^+$ было обратно пропорционально индексу массы тела (ИМТ) у больных раком эндометрия независимо от других клинических признаков. Частота выявления и уровни РЭФР выше медианы (93 фмоль/мг белка) в опухоли были достоверно ниже у больных с ожирением. При этом частота выявления РЭФР в опухолях эндометрия была в 1,8 раза ниже у пациенток с сахарным диабетом типа 2 (СД2), чем у пациенток без такового, а частота выявления РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$-опухолей оказалась минимальной у пациенток с ожирением II–III степени (5,6%) и с СД (0%). Показатели РЭ$^+$ и РП$^+$ в опухолях больных раком эндометрия не были связаны с ИМТ пациенток.

Анализ РЭФР с учетом стадии рака эндометрия показал, что частота выявления РЭФР$^+$ опухолей была достоверно ниже при III–IV, чем при I–II стадиях (соответственно 65,4 и 90,9%). При этом частота выявления и уровень РЭ$^+$ и РП$^+$ в опухолях эндометрия у больных в III–IV стадиях достоверно уменьшались (p=0,001). Отмечено также достоверное увеличение числа РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$-опухолей при III–IV стадиях заболевания (26,9%), по сравнению с I–II (3,0%). Напротив, число пациенток с положительным рецепторным статусом опухоли РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$ уменьшалось с ростом выраженности опухолевого процесса: с 33,3% – при I–II стадиях и до 19,2% – при III–IV стадиях (p=0,001).

Частота выявления РЭФР в первичной опухоли больных раком эндометрия с высокой степенью ее дифференцировки составила 64,7%, с умеренной – 25,0%, низкой – 52,2%; различие между 1-й и 2-й группами достоверно (p=0,001). При этом уровень РЭФР в опухолях эндометрия выше медианы (93 фмоль/мг белка) выявляли при высокодифференцированных (50,0%), реже – при низкодифференцированных (34,5%) и крайне резко – при умеренно дифференцированных опухолях (4,4%).

Частота выявления и содержание РЭ в опухоли не были связаны со степенью ее дифференцировки. В то же время установлено достоверное снижение частоты обнаружения РП в опухоли больных раком эндометрия по мере снижения степени ее дифференцировки: 91,2% – при высокой, 88,2% – при умеренной и 60,9% – при низкой степени (p=0,01). Медиана содержания РП в опухолях больных раком эндометрия была достоверно ниже при низкодифференцированных (81,2 фмоль/мг белка), чем при умеренно дифференцированных опухолях (288 фмоль/мг белка; p=0,01).

Выявлено достоверное уменьшение числа РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$-опухолей при снижении степени дифференцировки рака эндометрия: при высокой степени – 55,8%, умеренной – 25,0%, низкой – 17,4% (p=0,001).

РЭФР выявляли с одинаковой частотой при эндометриоидной аденокарциноме и железисто-плоскоклеточном раке эндометрия: 44,0 и 33,3% соответственно, при этом уровень РЭФР также не был связан с гистологическим вариантом строения опухоли (соответственно медиана – 98 и 88 фмоль/мг белка). В то же время частота выявления РЭ и РП была достоверно ниже при железисто-плоскоклеточном раке (75,8 и 69,7%), чем при эндометриоидной аденокарциноме (90,1 и 87,9%). Однако уровень РЭ и РП в первичных опухолях у пациенток этих групп достоверно не различался.

В эндометриоидных аденокарциномах чаще выявляли 3 вида рецепторов РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$, чем при железисто-плоскоклеточном раке (соответственно 42,0 и 3,5%; p=0,003). Частота обнаружения РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$-опухолей эндометрия в этих группах не различалась и составила соответственно 10,0 и 6,9%.

Установлена корреляционная зависимость между глубиной инвазии опухоли и содержанием РЭФР в первичной опухоли больных раком эндометрия (r=0,37; p=0,009). Частота выявления РЭФР$^+$-опухолей была наибольшей у больных раком эндометрия без инвазии (70%) и наименьшей – при глубине инвазии опухоли в стенку матки >2,0 см (0%; p=0,03). Однако отмечен сложный характер взаимосвязи значений РЭФР в опухоли с глубиной ее инвазии в стенку матки у больных раком эндометрия. Так, группа больных без опухолевой инвазии характеризовалась высокой частотой выявления РЭФР$^+$-опухолей (70,0%) и низким уровнем рецептора (26 фмоль/мг белка). Почти у половины больных (45,8%) с глубиной инвазии 1–1,4 см выявлены наиболее высокие значения РЭФР (240,0 фмоль/мг белка), при глубине инвазии в миометрий >2,0 см РЭФР не обнаружены.

Выявлены достоверно высокие медианы РЭ и РП в опухолях эндометрия при глубине инвазии 1,0–1,4 см в миометрий (соответственно 140,0 и 528,0 фмоль/мг белка) по сравнению с неизвазивными новообразованиями (соответственно 18,0 и 164,0 фмоль/мг белка), однако отмечено снижение содержания рецепторов стероидных гормонов при глубине инвазии опухоли в миометрий более 1,5 см (РЭ до 36,9 фмоль/мг белка и РП до 128,0 фмоль/мг белка).

Глубина инвазии рака эндометрия в стенку матки у 11 пациенток с отрицательным рецепторным статусом опухоли РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$ была достоверно больше (1,4±0,3 см), чем у 38 больных с положительным РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$ (0,7±0,1 см) (p=0,0001).

Не обнаружено корреляционной зависимости между РЭФР, РЭ, РП и размером первичной опухоли эндометрия. При этом частота выявления РЭ была недостоверно, а содержание РЭ – достоверно ниже в опухолях эндометрия с размерами новообразования от 4,0 см и более. Кроме того, отмечена тенденция к увеличению максимального размера опухоли эндометрия при отрицательном рецепторном статусе опухоли РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$.

10-летняя выживаемость больных раком эндометрия в общей группе после проведенного лечения составляли 53,2±4,7% (медиана 139 мес). Таким образом, половина обследованных больных прожили после проведенной терапии более 11 лет.

Отдаленные результаты лечения больных в Ia, Ib и II стадиях статистически не различались и 10-летняя выживаемость в этих группах была >70%. В то же время 3-летняя выживаемость при III стадии рака эндометрия равнялась 0% (медиана 21,5 мес), а однолетняя выживаемость больных в IV стадии – 27% (медиана 12 мес).

Существенно различались показатели общей выживаемости у больных с различными гистологическими вариантами строения рака эндометрия. Так, наиболее благоприятным был прогноз при эндометриоидной аденокарциноме; 10-летняя выживаемость составила 66%. У больных железисто-плоскоклеточным раком эндометрия 10-летняя выживаемость снижалась до 18,5% (медиана срока жизни 69,0 мес).

Все больные раком эндометрия с наличием в анамнезе сахарного диабета (СД) типа 2 (21 пациентка) не пережили 10 лет (медиана срока жизни 30,7 мес).

Многофакторный анализ отдаленных результатов лечения больных раком эндометрия показал, что независимыми факторами прогноза были стадия заболевания (p=0,00001), возраст (p=0,002) и наличие СД типа 2 (p=0,01).

Самостоятельной прогностической ценностью при раке эндометрия РЭФР в первичной опухоли не обладал. Так, 10-летняя выживаемость у больных раком эндометрия с РЭФР$^+$-опухолями составила 55,6±7,1%, тогда как с РЭФР$^-$ – 51,3±6,4%; различия недостоверны. Отмечено, что общая выживаемость больных раком эндометрия в прогностически благоприятной группе пациенток в возрасте до 60 лет достоверно различалась при РЭФР$^-$- и РЭФР$^+$-опухолях (соответственно 48,1±8,3 и 77,3±8,2%; p=0,007).

В то же время выживаемость больных раком эндометрия достоверно различалась в группах с РЭ$^+$- и РЭ$^-$-опухолями (p=0,009). Положительные уровни РЭ были прогностически благоприятным фактором рака эндометрия (табл. 1). Отметим, что только 12,8% (16 из 125) пациенток были с высоким риском неблагоприятного течения заболевания по фактору РЭ. Установлено, что выживаемость больных по статусу РЭ высокодостоверно различалась

только в возрасте до 60 лет (p=0,0004) и практически не различалась у пожилых пациенток (p=0,8). Так, 2-летняя выживаемость больных раком эндометрия в возрасте до 60 лет с РЭ$^-$-опухолью составила 25,0±14,8% (медиана срока жизни 18,3 мес), тогда как 10-летняя выживаемость с РЭ$^+$-опухолью равнялась 72,0±10,7%.

Еще более значимо связанным с отдаленными результатами лечения больных раком эндометрия оказался уровень РП в первичной опухоли (p=0,0002). Положительный уровень РП$^+$ был прогностически благоприятным фактором рака эндометрия (см. табл. 1). Отметим, что только у 19,2% (24 из 125) пациенток был высоким риск неблагоприятного течения заболевания по фактору РП. Установлено, что данная зависимость также была сильнее выражена у больных в возрасте до 60 лет (p=0,0006) и отсутствовала у пациенток старше 60 лет (p=0,1).

Многофакторный анализ связи основных клинических и морфологических факторов (стадия заболевания, степень дифференцировки опухоли и ее гистологическое строение, возраст пациенток, наличие сопутствующего СД типа 2, наличие ожирения, статус РЭФР, РЭ и РП) с отдаленными результатами лечения показал, что стадия заболевания (p=0,0001), наличие СД типа 2 (p=0,0006) и возраст 60 лет (p=0,0015) были независимыми факторами прогноза заболевания.

Установлено, что уровни РЭ и РП, определенные в первичной опухоли, были прогностически значимыми только при I и II стадиях рака эндометрия.

Была определена выживаемость больных раком эндометрия в группах с учетом рецепторного статуса опухоли (p=0,002; табл. 2). Худшие отдаленные результаты лечения выявлены в группах с отрицательным рецепторным статусом опухоли РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$, где показатели 10-летней общей выживаемости равнялась 18,2±11,6%.

Наилучшие результаты установлены при положительном рецепторном статусе опухоли РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$, при этом 10-летняя выживаемость составила 62,9$^+$7,9%, незначительно отличаясь от таковой у больных с РЭФР$^-$РЭ$^+$РП$^+$-опухолями (61,5±7,0%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные свидетельствуют о том, что РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$-опухоли у больных раком эндометрия чаще связаны с такими неблагоприятными клинико-морфологическими показателями, как большой размер первичной опухоли и глубина инвазии рака эндометрия в стенку матки, низкая степень дифференцировки опухоли и поздние (III–IV) стадии заболевания. Необходимо отметить, что прогностические свойства всех рецепторов проявлялись у больных раком эндометрия в возрасте до 60 лет и при I–II стадиях заболевания. В общей группе больных раком эндометрия 10-летняя выживаемость больных с РЭФР$^+$-опухолями оказалась выше, чем с РЭФР$^-$-опухолями более чем в 1,6 раза, с РЭ$^+$ – в 2,3 раза, с РП$^+$ – в 3,7 раза. Наилучшие отдаленные результаты отмечены в группе больных раком эндометрия с РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$-опухолями, а наихудшие – с

Таблица 1

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ С УЧЕТОМ СТАТУСА РЭ И РП В ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ

Рецепторы в опухоли	Медиана срока жизни, мес	Общая выживаемость, %		p
		5-летняя	10-летняя	
РЭ$^-$ (n=16)	21,5	25±10,8	25±10,8	0,009
РЭ$^+$ (n=109)	142,5	64,8±4,8	57,8±5,1	
РП$^-$ (n=24)	21,5	16,7±7,6	16,7±7,6	0,0002
РП$^+$ (n=101)	143,3	70,7±4,8	63,1±5,2	

Таблица 2

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЭНДОМЕТРИЯ С УЧЕТОМ РЕЦЕПТОРНОГО СТАТУСА ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ

Рецепторы в опухоли	Медиана срока жизни, мес	Общая выживаемость, %		p
		5-летняя	10-летняя	
РЭФР$^-$РЭ$^-$РП$^-$ (n=11)	18,3	18,2±11,6	18,2±11,6	0,002
РЭФР$^+$РЭ$^+$РП$^+$ (n=38)	Не достигнута	75,6±6,4	62,9±7,9	
РЭФР$^-$РЭ$^+$РП$^+$ (n=61)	139,0	74,9±6,1	61,5±7,0	
Прочие (n=15)	43,5	26,7±11,4	26,7±11,4	

рецепторным статусом РЭФР⁻РЭ⁻РП⁻. При многофакторном анализе только такие клинические признаки, как стадия заболевания (p=0,00001), наличие СД типа 2 (p=0,0006) и возраст пациенток до 60 лет (p=0,0015) могли служить независимыми факторами прогноза общей выживаемости.

Прорыв в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста опухолей, произошел после появления препарата Герцептин, представляющего собой гуманизированные моноклональные антитела к рецептору 2-го типа (HER2/neu) – уникальному представителю семейства, который, не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, является тем не менее ключевым звеном передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы [10]. Блокирование HER2/neu может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависимых от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения [15].

Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в лечении больных раком молочной железы (РМЖ), позволяя обеспечить максимальную эффективность Герцептина и избежать неоправданных затрат. Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации гена c-erbB-2 в опухолях РМЖ, то единого мнения о прогностической ценности этого маркера до недавнего времени не было, однако с 2005 г. рекомендовано исследовать экспрессию (лучше – амплификацию) HER2/neu в числе других факторов для формирования групп риска среди пациентов с ранними стадиями [11]. Есть также данные о том, что больные РМЖ с амплифицированным геном HER2/neu слабо реагирует на эндокринную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии, при этом считается, что больным с HER2/neu⁺ опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии. Клинические исследования РЭФР при раке эндометрия продолжаются; окончательные выводы еще не получены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М. Статистика злокачественных опухолей женских половых органов. В кн.: «Лекции по онкогинекологии» (Под ред. М.И. Давыдова, В.В. Кузнецова, В.М. Нечушкиной) // М. «МЕДпресс-информ». – 2009; 12–19.
2. Берштейн Л.М. Онкоэндокринология (традиции, современность, перспективы) // Санкт-Петербург. Наука. – 2004; 343 С.
3. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Давыдов М.И. Рецепторы семейства C-ERBB как мишени молекулярно-направленной противоопухолевой терапии: достижения, проблемы, перспективы // Молекулярная медицина. – 2010; 4: 5–10.
4. Давыдов М.И., Летягин В.П., Кузнецов В.В. Опухоли женской репродуктивной системы // М. Медицинское информационное агентство. – 2007; 376 С.
5. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты // Санкт-Петербург. Издательский дом СПбМАПО. – 2007; 211 С.
6. Коломиец Л.А. (Под ред.). Метаболизм и рецепция эстрогенов при гиперпластических процессах и раке эндометрия // Томск. Издательство научно-технической литературы. – 2007; 188 С.
7. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К., Дигаева М.А. Молекулярные маркеры опухолей // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2009; 148 (8): 199–208.
8. Урманчеева А.Ф., Тюляндин С.А., Моисеенко В.М. (Под ред.). Практическая онкогинекология: избранные лекции // Санкт-Петербург. Издательство «Центр ТОММ». – 2008; 400 С.
9. Benraad T., Foekens J. Hydroxylapatite assay to measure epidermal growth factor receptor in human primary breast tumours // Ann. Clin. Biochem. – 1990; 27: 272–73.
10. De Laurentiis M., Cancello G., Zinno L. et al. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology // Ann. Oncol. – 2005; 16 (Suppl. 4): 7–13.
11. Goldhirsch A., Glick J., Gelber R. Panel Members Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005 // Ann. Oncol. – 2005; 16: 1569–83.
12. Harari P. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology // Endocr. Relat. Cancer. – 2004; 11: 689–708.
13. Jemal A., Siegel M., Ward D. Cancer statistics // C. A. Cancer J. Clin. – 2006; 56: 106–30.
14. Klijn J., Look M., Portengen H. et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study // Breast Cancer Res. Treat. – 1994; 29: 73–83.
15. Plosker G., Keam S. Trastuzumab: a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer // Drugs. – 2006; 66 (4): 449–75.
16. Rollerova E., Urbancikova M. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (review) // Endocrine Regulations. – 2000; 34: 203–18.
17. Sherman M. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach // Mod. Pathol. – 2000; 13: 295–308.
18. Wang A., Hartzfeld K., Hughes M. Рак эндометрия. В кн.: Онкогинекологический атлас. Классификация и определение стадии опухолей. Принципы лечения (Под ред. Дж.Р. Смита, Д. Хили, Дж. Дель Приоре). – М.: Практическая медицина. – 2010; 24–7.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.14-006.36-091.8;577.21

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОМЫ ТЕЛА МАТКИ ПО ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, STS, SULT И PTEN

С.В. Шрамко[1], кандидат медицинских наук, **А.С. Лещенко**[2],
Е.П. Хвостова[3], кандидат биологических наук, **М.А. Сабанцев**[1],
Л.Г. Баженова[4], доктор медицинских наук, доцент,
Л.Ф. Гуляева[2, 3], доктор биологических наук, профессор

[1]Городская клиническая больница №1, Кемеровская область, Новокузнецк,
[2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск,
[3]Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск,
[4]Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей МЗ РФ, Новокузнецк

E-mail: ivanovakatysha@mail.ru

Миома тела матки является одной из наиболее распространенных доброкачественных опухолей женской репродуктивной системы. Так как эта патология в большинстве случаев является гормональнозависимой, нами был определен уровень экспрессии генов стероидных рецепторов ERs, PR, эстрогеновой сульфотрансферазы (SULT1E1), стероидной сульфатазы (STS) и тирозиновой фосфатазы (PTEN) в миоматозных узлах 33 женщин с помощью обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Выявлено достоверное увеличение уровня мРНК генов ERα, ERβ, PgR и гена PTEN в образцах пролиферирующей и непролиферирующей миомы матки, а также снижение экспрессии генов STS, PTEN и PgR в образцах миомы матки с сопутствующей гиперплазией и малигнизированной миомой.

Ключевые слова: *миома матки, эстрогеновые рецепторы, прогестероновый рецептор, стероидная сульфатаза, стероидная сульфотрансфераза, PTEN*

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF UTERINE LEIOMYOMA ACCORDING TO EXPRESSION OF GENES OF STEROID RECEPTORS, STS, SULT AND PTEN

S.V. Shramko[1], A.S. Leshchenko[2], E.P. Khvostova[3], M.A. Sabantsev[1], L.G. Bazhenova[4], L.F. Gulyaeva[2, 3]
[1]City Clinical Hospital № 1, Novokuznetsk
[2]Novosibirsk State University
[3]Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk
[4]Novokuznetsk Postgraduate Physician Institute

Leiomyoma is one of the most common benign tumors of the female reproductive system. As this pathology in most cases is hormone dependent, we determined the level of gene expression of steroid receptors ERs, PR, estrogen sulfotransferase SULT1E1, STS steroid sulphatase and tyrosine phosphatase PTEN in myoma nodes in 33 women using Real-time RT-PCR. A significant increase in the level of mRNA of the ERα, ERβ, PgR, and the PTEN gene in samples from proliferative and non-proliferative uterine leiomyoma, as well as the decrease in the expression of genes STS, PTEN and PgR in samples of myoma associated with hyperplasia and malignant uterine have been identified.

Key words: *uterine cancer, estrogen receptor, progesterone receptor, steroid sulfatase, steroid sulfotransferase, PTEN*

Миома матки – одна из наиболее распространенных доброкачественных опухолей репродуктивной системы. Средний возраст выявления миомы матки составляет 32,8 года. Данное заболевание относительно редко встречается у женщин до 30 лет (0,9–1,5%), а в возрасте старше 30 лет выявляется в 15–17% наблюдений [2]. Истинная распространенность лейомиомы матки, выявляемая по материалам аутопсий, составляет 50–62% [1]. Отметим, что происходит увеличение числа молодых женщин с патологией матки в возрасте до 35 лет, а возраст рождения первого ребенка смещается с 25 к 30 годам. Интерес к исследованию данной патологии у женщин репродуктивного возраста обусловлен сохранением не только детородной функции, но и высокого качества жизни.

Из данных литературы известно, что около 20% женщин в возрасте старше 18 лет, в том числе около 70% – в период от 30 до 40 лет, лишаются матки в результате хирургического лечения [3]. Более половины хирургических вмешательств в гинекологических отделениях выполняют по поводу миомы матки. Поскольку эта патология в большинстве случаев является гормональнозависимой, одной из важных

характеристик становится определение рецепторного статуса по экспрессии стероидных рецепторов ERα, ERβ, PR. Другой возможной причиной может быть нарушение баланса сульфонирования и десульфатирования эстрогенов [14]. Этот процесс играет немаловажную роль в регуляции активности и транспорта стероидных гормонов. Сульфаты эстрогенов могут служить резервуаром для образования биологически активных эстрогенов под действием стероидной сульфатазы (STS) [16]. Любое нарушение в одной из этих систем вызывает изменение в содержании эстрогенов, что может стать причиной возникновения опухоли. В последнее время широко обсуждается роль фермента PTEN в развитии различных опухолевых процессов. Уникальная фосфатидид-3-фосфатазная активность PTEN делает его одним из ключевых супрессоров опухолей в организме [6].

Таким образом, молекулярная характеристика миомы матки может быть использована для персонализированного подхода к лечению и прогнозу данных заболеваний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для определения уровня экспрессии генов стероидных рецепторов, эстрогеновой сульфотрансферазы, стероидной сульфатазы и PTEN использовали образцы ткани миомы матки, удаленные в ходе хирургического вмешательства: у 10 пациенток с диагнозом миомы тела матки, 10 – с пролиферирующей миомой тела матки, 8 – с миомой тела матки и гиперплазией эндометрия, 5 – с лейомиосаркомой. В качестве контрольных использованы образцы неизмененной ткани миометрия из удаленных участков матки одной и той же пациентки. Операционный материал получали из ГКБ №1 г. Новокузнецка. Взятие образцов миометрия проводил врач гинекологического отделения С.В. Шрамко (табл. 1) с согласия больных по стандартному протоколу этического комитета РФ. Сразу после хирургического вмешательства свежий образец ткани помещали в емкость с жидким азотом до процедуры выделения РНК.

Выделение суммарной РНК из образцов и ДНКазную обработку проводили с использованием наборов Qiagen (Rneasy Lipid Tissue® Mini Kit и RNase-Free DNase Set соответственно, США) согласно рекомендациям производителя. Количество РНК в пробе определяли спектрофотометрическим методом. Качественный анализ выделенной РНК осуществляли путем электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле.

Уровень экспрессии исследуемых генов определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием Maxima SYBR Green qPCR Master Mix («Fermentas») на амплификаторе IQ5 («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» *GAPDH*.

В ПЦР использовали специфические праймеры к последовательностям генов *ERα, ERβ, PGR, SULT1E1, hSTS, PTEN* (табл. 2).

Каждую ПЦР, содержащую 1 мкл кДНК, проводили в объеме 25 мкл при следующих условиях:

Таблица 1

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ МИОМОЙ ТЕЛА МАТКИ

Показатель	Пролиферирующая миома	Непролиферирующая миома	Миома матки с гиперплазией эндометрия	Лейомиосаркома
Возраст, годы	39,4±11,4	39,3±6,3	52,1±11,9	53,2±13,8
Длительность заболевания, годы	7,2±7,8	7,7±9,3	4,8±6,2	9,2±9,8
Нарушения менструального цикла*	7/3; 1/2; 0/1; 2/0	5/3; 0/2; 0/1; 5/0	5/3; 1/2; 2/1; 1/0	3/3; 0/2; 1/1; 1/0
Учащенное мочеиспускание	2	3	2	1
Возраст менархе, годы	13,3±1,7	13,3±2,7	12,2±1,8	13,4±2,6
Продолжительность менструации, дни	5,3±2,3	5,6±3,4	4,8±2,2	4,8±2,2
Продолжительность менструального цикла, дни	34,7±61,3	24,7±3,7	24,7±3,7	27,2±4,2
Роды	1,0±3,0	1,4±1,4	1,2±1,2	1,8±0,8
Аборты	2,7±7,3	2,1±3,9	4,0±11,0	6,0±10,0
Выкидыши	0,1±0,1	0,1±0,1	0,22±1,78	0,4±0,6
Объем операции**	3/2; 3/1; 4/0	0/2; 7/1; 3/0	5/2; 4/1; 0/0	4/2; 1/1; 0/0

* В числителе – число больных, в знаменателе – вид патологии: 3 – гиперполименорея; 2 – меноррагия; 1 – менопауза; 0 – нет нарушений; ** в числителе – число больных, в знаменателе – объем вмешательства: 0 – консервативная тактика; 1 – гистерэктомия без придатков; 2 – гистерэктомия с придатками.

95°С – 3 мин, 95°С – 15 с (40 циклов), 58°С – 20 с, 72°С – 20 с. Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления и гель-электрофорез. В каждом эксперименте на 1 планшет помещали образцы исследуемых кДНК с праймерами на целевые гены и ген сравнения (по 3 повтора). Параметры ПЦР рассчитывали по дозо-зависимым кривым: эффективность реакции – не менее 90%, коэффициент корреляции – не менее 0,98, наклон кривой (slope) – 3,4±0,4.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы MedCalc; статистически значимыми считали $p<0,05$. Среднее, ошибку среднего и достоверность различий между 2 параметрами рассчитывали по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологический эффект эстрогенов реализуется через их взаимодействие с рецепторами эстрогенов, которые, в свою очередь, активируют гены-мишени во многих тканях. В настоящее время известны 2 изоформы ER – ERα и ERβ. Активация ERβ приводит к изменению регуляции клеточного цикла через взаимодействие с циклинами и их киназами и, как следствие, – к усилению пролиферации [7, 10]. Гиперэкспрессия *ERα* в нормальной ткани увеличивает риск возникновения гормональнозависимой опухоли. Важное различие между ERα и ERβ состоит в регуляции клеточной пролиферации: ERα наиболее часто проявляет пролиферативное действие, ERβ – антипролиферативное [11]. Отношение степени распределения экспрессии ERα и ERβ может играть ключевую роль в нормальном функционировании эндометрия и миометрия, что имеет существенное клиническое значение [18]. Наряду с эстрогенами важную роль в организме женщины играет прогестерон – стероидный гормон, который вырабатывается во время эмбриогенеза, менструального цикла и беременности. Одна из физиологических ролей прогестерона в регуляции железистого эпителия эндометрия заключается в индукции клеточной дифференцировки и ингибировании эстроген-опосредованной клеточной пролиферации [12].

При исследовании рецепторного статуса миомы тела матки нами выявлено достоверное увеличение экспрессии генов *ERα* и PR у больных с простой ($p=0,03$) и пролиферирующей миомами матки ($p=0,01$), а также у больных с миомой тела матки и гиперплазией эндометрия ($p=0,03$). Снижение экспрессии данных генов отмечено у пациентов с диагнозом лейомиосаркомы ($p=0,06$; см. рисунок).

Из данных научной литературы известно, что в матке, как и в молочной железе, эстрогены увеличивают пролиферацию клеток. Кроме того, в гиперплазированных тканях отмечено увеличение экспрессии гена *ERα* [19]. Отсутствие или снижение экспрессии *ERα* является показателем плохого прогноза (развивается гормональнонезависимая опухоль, плохо поддающаяся терапии) [17]. Содержание прогестероновых и эстрогеновых рецепторов зависит от степени васкуляризации миоматозных узлов. В гиперваскулярных узлах отмечается значительное преобладание рецепторов к прогестерону по сравнению с таковым в гиповаскулярных узлах [15]. Таким образом, миома с повышенной васкуляризацией находится под преимущественным влиянием прогестерона. Это позволяет сделать вывод, что опухолевый рост лейомиомы обусловлен повышенной прогестероновой стимуляцией, поскольку прогестерон, являясь половым гормоном, модулирует митотическую активность в миометрии и миоматозных узлах.

Кроме того, нами отмечено достоверное увеличение уровня мРНК *ERβ* у больных с диагнозом пролиферирующей миомы ($p=0,01$) и миомы с гиперплазией эндометрия ($p=0,01$). Выявлено также недостоверное увеличение содержания данного рецептора у больных с простой миомой ($p=0,07$) и лейомиосаркомой ($p=0,07$; см. рисунок).

Из полученных в ряде исследований данных следует, что соотношение мРНК ERβ/ERα находится в прямой зависимости от стадии рака эндометрия [20]. В исследовании F. Takama и соавт. показано [18], что

Таблица 2

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР

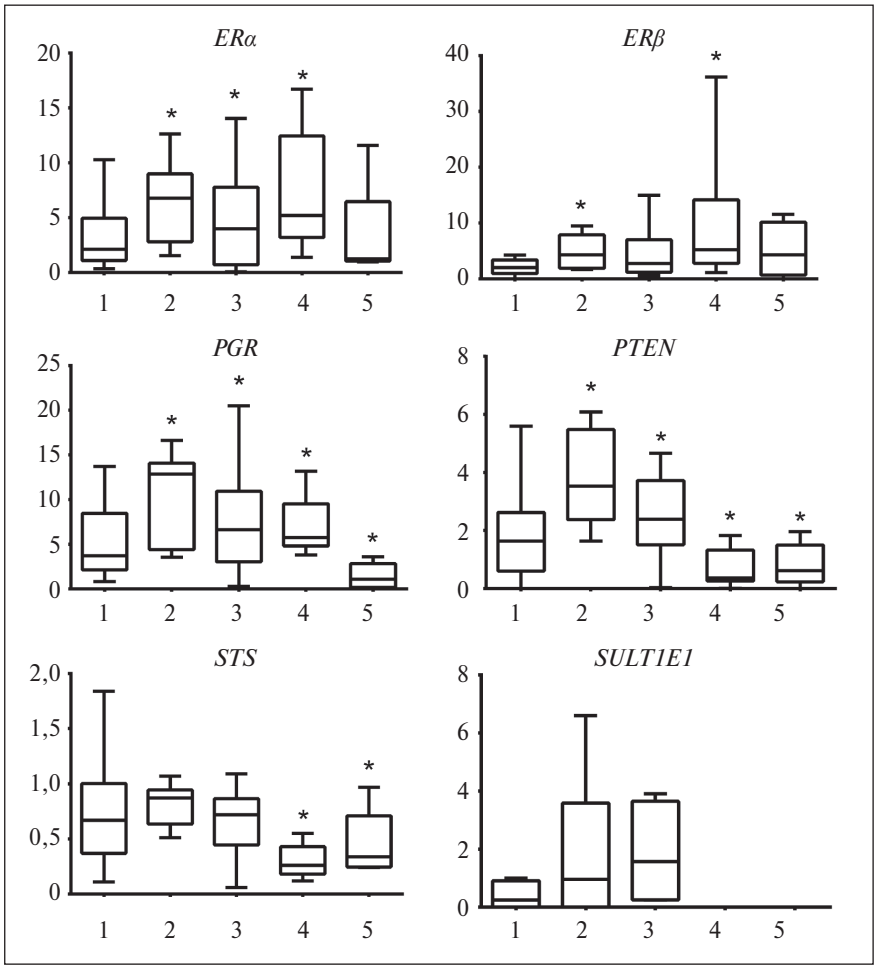
Ген	Последовательность праймера (прямой и обратный)	
PTEN	Прямой	5’- CGAACTGGTGTAATGATATGT- 3'
	Обратный	5’- CATGAACTTGTCTTCCCGT- 3'
STS	Прямой	5'- CCTCCTACTGTTCTTTCTGTGGG-3'
	Обратный	5'- GGTCGATATTGGGAGTCCTGATA-3'
SULT1E1	Прямой	5’- AGAGGAGCTTGTGGACAGGA – 3'
	Обратный	5’- GGCGACAATTTCTGGTTCAT – 3'
PGR	Прямой	5’- TCATTCTATTCATTATGCCTTACCA – 3’
	Обратный	5’- GACTTCGTAGCCCTTCCAAAG – 3’
ERβ	Прямой	5’- GTCACAGCGACCCAGGAT – 3’
	Обратный	5’- CAAAAGAGTCTCCATCTTCATTC – 3’
ERa	Прямой	5’- ATGATGAAAGGTGGGATACGA-3`
	Обратный	5’- CTGTTCTTCTTAGAGCGTTTGATC-3’

экспрессия ERβ, выше чем ERα, при раке эндометрия с тяжелыми поражением миометрия, на основании чего сделан вывод, что ERβ играет важную роль в прогрессировании поражения миометрия [18]. Таким образом, дисбаланс между экспрессией ERα и ERβ считается важным шагом в развитии эстрогензависимых опухолей [13].

Для исследования роли сульфонирования эстрогенов в патогенезе миомы нами определено относительное содержание мРНК гена *SULT1E1*. Полученные результаты показали, что уровень экспрессии гена *SULT1E1* достоверно не изменялся, кроме того, у больных с диагнозом миомы с гиперплазией эндометрия и лейомиосаркомы экспрессия данного гена отсутствовала. Из данных литературы известно, что в ткани с уменьшенной экспрессией гена понижена и активность соответствующего фермента. Это может приводить к повышению концентрации эстрогенов и катехолэстрогенов и, следовательно, увеличивать риск новообразований, что показано для рака молочной железы [8]. Предполагается, что баланс между сульфонированием и десульфонированием в тканях может играть важную роль в регуляции уровней эстрогенов *in situ*. Сульфаты эстрогенов могут служить резервуаром для образования биологически активных эстрогенов посредством действия STS [16]. Следовательно, определение уровня экспрессии гена *STS* является важным шагом в изучении механизма развития миомы матки. Достоверных различий в экспрессии данного гена у больных миомой и пролиферирующей миомой не выявлено (p=0,2). Показано достоверное снижение уровня мРНК гена *STS* у больных с диагнозом миомы с гиперплазией эндометрия (p=0,01) и лейомиосаркомы (p=0,03; см рисунок).

Анализируя полученные данные, можно заключить, что в опухолевых тканях эндометрия регистрируется повышение экспрессии гена *STS*, тогда как экспрессия гена *SULT1E1* имеет тенденцию к снижению. Интересен тот факт, что в тканях, где экспрессия гена *STS* снижается, экспрессии эстрогеновой сульфатазы вообще не определяется. Это свидетельствует о вовлечении ферментов сульфонирования/десульфонирования эстрогенов в механизм возникновения и поддержания гормональнозависимых опухолей эндометрия человека. STS осуществляет реакцию гидролиза сульфатов эстрона, из которого могут быть синтезированы стероиды с эстрогенными свойствами (например, эстрадиол), стимулирующие рост опухоли. В этом случае индукция *SULT1E1* и/или ингибирование *STS* могут иметь потенциальный лечебный эффект в терапии миомы матки.

При исследовании экспрессии гена *PTEN* нами показаны достоверное увеличение экспрессии данного гена у пациенток с непролиферирующей (p=0,03) и пролиферирующей миомой (p=0,001) и, наоборот, достоверное снижение уровня мРНК гена *PTEN* у больных с диагнозом миомы с гиперплазией эндометрия (p=0,02) и лейомиосаркомы (p=0,1; см. рисунок). Известно, что PTEN является опухолевым супрессором за счет ингибирования PI3K-Akt-пути. PTEN дефосфорилирует PIP3 до PIP2,



*Уровень экспрессии генов ERα, ERβ, PGR, STS, SULT1E1, PTEN в образцах тканей: 1 – нормальный миометрий; 2 – пролиферирующая миома матки; 3 – непролиферирующая миома матки; 4 – миома матки с гиперплазией эндометрия; 5 – лейомиосаркома; по оси ординат – относительная экспрессия гена, рассчитанная с использованием $2^{-2\Delta Ct}$-метода; горизонтальные линии – медиана; *p<0,05*

являясь, таким образом, частью сигнального пути, который останавливает клеточное деление и индуцирует апоптоз. Это предотвращает бесконтрольный рост клеток и развитие онкологического процесса [21]. Тогда нарушение его функционирования приводит к развитию широкого спектра опухолей человека (рака предстательной железы, эндометрия, яичников, молочной железы) [4]. В настоящее время экспрессия и регуляция PTEN в миометрии и лейомиомах до конца не изучены. Известно, что уровень белка PTEN в железистом эпителии эндометрия при атипичной и простой гиперплазиях ниже, чем в неизмененном эндометрии [9]. D. Takiko и соавт. [5] показали, что делеции в гене *PTEN* приводят к трансформации миоцитов в адипоциты и формированию липолейомиомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проблема опухолей женской репродуктивной системы остается одной из актуальных в клинической онкологии. Это связано не только с неуклонным ростом заболеваемости в группе зрелого женского населения, но и увеличением числа пациенток репродуктивного возраста. Кроме того, отмеченный в популяции рост эндокринно-обменных нарушений, относительной гиперэстрогении, позволяет прогнозировать дальнейший рост числа гормональнозависимых заболеваний женской репродуктивной системы. Анализ полученных результатов показывает, что, характеристика опухолей по экспрессии генов *ERα, ERβ, PGR, SULT1E1, hSTS, PTEN* может быть стратегией и одним из этапов разработки дифференциального лечения опухолей матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаков В.И., Прилепская В.Н., Радзинский В.Е. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии // М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2007; 200 с.
2. Сидорова И.С. Миома матки (современные аспекты этиологии, патогенеза, классификации и профилактики) // М.: Изд-во МИА. – 2003; 66 с.
3. Савицкий Г.А., Савицкий А.Г. Миома матки: проблемы патогенеза и патогенетической терапии // ЭЛБИ-СПб, 3-е изд. – 2003; 235 с.
4. Cubery J., Steelman L., Chappell W. et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance // Oncotarget. – 2012; 3 (10): 1068–111.
5. Takiko D., Lindsey J., Besnard V. et al. Cell-specific conditional deletion of Pten in the uterus results in differential phenotypes // Gynecol. Oncol. – 2011; 122 (2): 424–29.
6. Ghita C., Vilcea I., Dumitrescu M. et al. The prognostic value of the immunohistochemical aspects of tumor suppressor genes p53, bcl-2, PTEN and nuclear proliferative antigen Ki-67 in resected colorectal carcinoma // Rom. J. Morphol. Embryol. – 2012; 53 (3): 549–56.
7. Foxa E., Andradeb J., Shupnik M. Novel actions of estrogen to promote proliferation: Integration of cytoplasmic and nuclear pathways // Steroids. – 2009; 74: 622–7.
8. Kulendran M., Salhab M., Mokbel K. Oestrogen-synthesising enzymes and breast cancer // Anticancer Res. – 2009; 29 (4): 1095–109.
9. Kimura F., Watanabe J., Hata H. et al. PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometroid adenocarcinoma of the uterine corpus // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2004; 130: 161–68.
10. La Rosa P., Acconcia F. Signaling functions of ubiquitin in the 17β-estradiol (E2): estrogen receptor (ERα) network // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2011; 127 (3–5): 223–30.
11. Matthews G. Estrogen signaling: Subtle balance between ERα and ERβ // Molecular Interventions. – 2003; 3: 281–92.
12. Mani S. Progestin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown // Endocrinology. – 2008; 149 (6): 2750–56.
13. Mylonas I., Jeschke U., Shabani N. et al. Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ERα), estrogen receptor Beta (ERβ) and progesterone receptor (PR) // Anticancer Res. – 2005; 25: 1679–86.
14. Purohit A., Foster P. Steroid sulfatase inhibitors for estrogen- and androgen-dependent cancers // Endocrinol. – 2012; 212 (2): 99–110.
15. Kim J., Sefton E. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma // Mol. Cell. Endocrinol. – 2012; 358 (2): 223–31.
16. Sugawara T., Fujimoto S. The potential function of steroid sulphatase activity in steroid production and steroidogenic acute regulatory protein expression // Biochemistry. – 2004; 380: 153–60.
17. Sahab Z., Man Y., Byers S., Sang Q. Putative biomarkers and targets of estrogen receptor negative human breast cancer // Int. J. Mol. Sci. – 2011; 12 (7): 4504–21.
18. Takama F., Kanuma T., Wang D. et al. Oestrogen receptor beta expression and depth of myometrial invasion in human endometrial cancer // Br. J. Cancer. – 2001; 84: 545–9.
19. Thomas C., Gustafsson J. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy // Nat. Rev. Cancer. – 2011; 11 (8): 597–608.
20. Zhou X., Tengy X., Song W., Wu Y. Expression of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells and estrogen receptor subtypes in the normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2008; 18: 152–8.
21. Zhang P., Chen J., Guo X. New insights into PTEN regulation mechanisms and its potential function in targeted therapies // Biomed. Pharmacother. – 2012; 66 (7): 485–90.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.11-006-091.8

СОДЕРЖАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И ИХ ЛИГАНДОВ В ОПУХОЛЯХ ЯИЧНИКОВ

И.Б. Манухин[1], доктор медицинских наук, профессор,
О.А. Шарашенидзе[1], **В.Д. Ермилова**[2], кандидат медицинских наук,
Ю.В. Крюк[2], кандидат медицинских наук, **О.И. Костылева**[2], кандидат медицинских наук
[1]Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова МЗ РФ,
[2]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
E-mail: kruk.yulya@gmail.com

Представлены данные радиолигандного определения содержания рецепторов эпидермального фактора роста (РЭФР) и радиорецепторного анализа уровня ЭФР-подобных пептидов (ЭФР-ПП) в опухолях 44 больных раком яичников (РЯ) и в образцах тканей 10 доброкачественных новообразований яичников. Частота выявления и уровень РЭФР были достоверно выше при РЯ, чем в доброкачественных опухолях. Частота выявления и содержание ЭФР-ПП не различались в доброкачественных и злокачественных новообразованиях яичников. Для доброкачественных новообразований яичников наиболее характерен рецепторный фенотип РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$ (60%), тогда как в опухолях при РЯ такое сочетание выявлено только в 35% наблюдений.

Ключевые слова: *РЭФР, ЭФР-подобные пептиды, рак яичников*

CONTENT OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS AND ITS LIGANDS IN OVARIAN TUMORS

I.B. Manukhin[1], O.A. Sharashenidze[1], V.D. Ermilova[2], Yu.V. Kryuk[2], O.I. Kostyleva[2]
[1]Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov
[2]N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Results of radioligand determination of epidermal growth factor receptor (EGFR) and radioreceptor assessment of EGF-like peptides' (EGFLP) levels in the tumors of 44 ovarian cancer and 10 benign ovarian tumor patients are presented. Frequency of revelation and content of EGFR in ovarian cancer were significantly higher than in benign tumors, whereas no differences between benign and malignant ovarian lesions were revealed for EGFLP levels. In the majority (60%) of benign tumors EGFR$^-$ EGFLP$^-$ receptor phenotype was demonstrated, while such marker combination was found in only 35% of ovarian cancer samples.

Key words: *EGFR, EGF-like peptides, ovarian cancer*

Рак яичников (РЯ) считают одним из наиболее распространенных и крайне неблагоприятных прогностически заболеваний у женщин [2, 7]. В настоящее время в развитых странах РЯ по-прежнему занимает 1-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований женских половых органов [18]. Средняя 5-летняя выживаемость больных РЯ составляет 40–50% [16], однако при I стадии РЯ она достигает 70–80%, при II – 57–67%, при III–IV – всего 5–10%. Стало быть, раннее выявление РЯ позволяет радикально улучшить показатели выживаемости данной категории больных.

Этиология большинства опухолей, в том числе и РЯ, остается неизвестной [1], патогенез изучен не до конца. Вместе с тем существенное место в патогенезе РЯ принадлежит онкогенам *K-ras, c-erbB2/HER2*, гену-супрессору *p53*; последний играет важную роль в апоптотическом самоустранении клеток, получивших критические повреждения ДНК [14]. У носительниц мутаций генов *BRCA-1* и *BRCA-2* риск РЯ достигает 60%.

Сложность ранней диагностики РЯ связана не только с отсутствием симптомов заболевания, но и со сложностью их дифференциальной диагностики, а также многообразием его гистологических вариантов. Установлено, что большинство (90–95%) всех новообразований яичников – это эпителиальные опухоли (доброкачественные, пограничные и злокачественные) [10].

Трудности ранней диагностики и высокий метастатический и инвазивный потенциал РЯ определяют необходимость углубленного изучения механизмов распространения опухоли, знание которых позволит индивидуализировать прогноз рака яичников, улучшить мониторинг и оптимизировать подходы к назначению неоадъювантной и адъювантной химиотерапии.

В последнее десятилетие пристальное внимание исследователей привлекает изучение локальных ме-

ханизмов регуляции активности опухолевых клеток, особенно паракринных и аутокринных, так как их нарушения чаще всего сопровождают патологические процессы. Нарушение процессов их регуляции может приводить к генетическому «сбою» пролиферации, что в свою очередь может «запускать» механизм неопластической трансформации [11, 12].

В отличие от классических опухолевых маркеров, выявляемых в сыворотке крови, которые служат важным инструментом диагностики отдельных типов опухолей (например, СА-125 при РЯ) и мониторинга эффективности лечения, раннего обнаружения рецидива заболевания, клеточные и тканевые маркеры определяют непосредственно в опухолевой ткани; они характеризуют ее биологические особенности, специфику поведения и регуляции (гормональную чувствительность, способность к метастазированию, пролиферативную активность) [3, 9, 19, 20]. Конкретная биологическая функция некоторых молекулярных маркеров пока не установлена. Практически ни один из молекулярных маркеров в их традиционном значении не может быть использован для дифференциальной диагностики и тем более для мониторинга [4, 5]. Их роль другая – характеризуя биологические особенности каждой конкретной опухоли, они могут помочь в прогнозировании исхода заболевания и в индивидуализации лекарственной терапии [13].

Именно механизмы аутокринной и паракринной регуляции опухолевого роста, в отличие от центрального эндокринного механизма, чаще способны обеспечить быстрое и относительно независимое от остального организма развитие опухолевого процесса [5, 8].

Среди наиболее активных ауто- и паракринных регуляторов можно выделить эпидермальный фактор роста (ЭФР) и некоторые другие, гомологичные первичной структуре лиганды (α-трансформирующий фактор роста, амфирегулин и др.), связывающиеся с общим трансмембранным рецептором, названным по титульному лиганду рецептором эпидермального фактора роста (РЭФР) [6, 15]. Связывание лигандов с РЭФР вызывает в нем конформационные изменения. Во-первых, происходит димеризация рецептора, мономеры которого в отсутствие лигандов находятся в динамическом равновесии. Во-вторых, это ведет к активации внутриклеточного домена с проявлением рецепторной тирозинкиназной активности и, как следствие, – к аутофосфорилированию РЭФР как минимум по 3 остаткам тирозина в С-концевом участке молекулы (Tyr-1068, Tyr-1148, Tyr-1173). Кроме того, активированная тирозинкиназа РЭФР фосфорилирует также ряд важных для пролиферации белков.

Показано, что одной из важнейших причин прогрессирования заболевания при РЯ является нарушение работы системы ЭФР, в которую входят как сам ЭФР в качестве лиганда, так и еще 3 рецептора семейства ErbB, что приводит к автономной пролиферации клеток РЯ [17].

Целью настоящего исследования были сравнительный анализ содержания РЭФР и ЭФР-подобных пептидов (ЭФР-ПП) в злокачественных и доброкачественных эпителиальных опухолях яичников и установление их связи с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кусочки опухоли массой 300–500 мг непосредственно после операции доставляли на льду в лабораторию и либо сразу подвергали гомогенизации, либо хранили в течение 1–30 дней при -70°С. Ткань гомогенизировали в TED-буфере (10 мМ трис-HCl, 1,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотрейтола; pH 7,4), содержащем 10% глицерина (по объему), и гомогенат и центрифугировали 30 мин при 105 000 об/мин и температуре 4°С (центрифуга Optima TM TLC, Beckman, США). 1 мл надосадочной жидкости (цитозоля) замораживали при -70°С, затем лиофилизировали и хранили лиофилизированные препараты до момента определения концентрации ЭФР-ПП. Осадок, полученный после центрифугирования, регомогенизировали в 1 мл буфера А (0,25 мМ K,Na-PBS, 70 мг/л бацитрацина, 1 г/л бычьего сывороточного альбумина) и центрифугировали еще раз в течение 10 мин при 2000 об/мин и 4°С на той же центрифуге. Надосадочную фракцию, представляющую собой грубую мембранную суспензию, замораживали в жидком азоте, хранили при -70°С и затем использовали для определения РЭФР.

Содержание РЭФР в мембранной фракции опухолей и неизмененных тканей изучали модифицированным радиолигандным методом [3]. В качестве меченого лиганда использовали мышиный ЭФР (receptor grade; «Sigma», США), йодированный с помощью ^{125}I-Na в присутствии хлорамина Т. 0,1 мл суспензии мембран инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (20–25°С) с 3,5 нМ ^{125}I-ЭФР в присутствии и в отсутствие 200-кратного избытка немеченого ЭФР («Sigma», США), периодически встряхивая в миксере. По окончании инкубации пробирки помещали в ледяную баню и осаждали лиганд-рецепторный комплекс охлажденной суспензией гидроксилапатита («Sigma»; DNA-grade) в PBS-буфере (2:1 по объему). Добавляли к пробам по 0,5 мл PBS и центрифугировали 3–5 мин при 2000 об/мин, 4°С (центрифуга РС-6), надосадочную жидкость удаляли, и затем трижды промывали осадок гидроксилапатита 1 мл PBS. Подсчитывали радиоактивность осадка на гамма-счетчике (LKB, Швеция) и вычисляли количество специфически связанного ^{125}I-ЭФР по разнице между общим и неспецифическим связыванием. Количество РЭФР выражали в фмоль/мг мембранного белка.

Содержание ЭФР-ПП определяли радиорецепторным методом [3]. В качестве связывающей системы использовали суспензию мембран плаценты человека, содержащую большое количество РЭФР (3261+172 фмоль/мг белка). Данным методом определяется суммарное содержание всех пептидов, взаимодействующих с РЭФР (самого ЭФР, α-ТФР, амфирегулина, cripto и др.). Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали рекомбинантный человеческий α-ТФР («Sigma», США). В пластмассовые пробирки помещали по 25000–35000 cpm ^{125}I-ЭФР в 10 мкл буфера А и по 30 мкл калибровочных растворов α-ТФР или исследуемых лиофилизированных цитозолей, растворенных непосредственно перед определением в 200 мкл буфера А. Далее проводили инкубацию и осаждение лигандрецепторных комплексов гидроксилапатитом, как описано в методе определения РЭФР. Просчитывали радиоактивность осадков на гамма-счетчике, строили калибровочные кривые зависимости связанной с рецептором радиоактивности от количества добавленного в пробу α-ТФР и рассчитывали содержание ЭФР-ПП в исследуемых образцах, выражая его в пг/мг ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РЭФР определили в образцах ткани 12 доброкачественных новообразований яичников (контрольная группа). В 75% обследованных образцов РЭФР не обнаружены (табл. 1) и только в 3 опухолях их содержание не превышало 13 фмоль/мг белка (пороговое значение).

РЭФР выявлены в 17 первичных опухолях яичников у 44 (38,6%) больных РЯ; 16 (36,4%) наблюдениях, их содержание в РЯ превышало пороговый уровень в контроле (13 фмоль/мг белка; p=0,01). Наибольшее содержание РЭФР в опухоли больных РЯ составило 1120 фмоль/мг белка, что многократно превышало пороговое значение РЭФР в доброкачественных новообразованиях яичников (табл. 1).

Частота обнаружения ЭФР-ПП в опухолях яичников составила 60% в группе больных с доброкачественными образованиями и 54,8% – у больных РЯ (p>0,05; табл. 2). Медианы содержания ЭФР-ПП в указанных группах больных также не различались (соответственно 269 и 244 пг/мг ДНК). При этом у 11,9% больных РЯ значения ЭФР-ПП в опухоли были выше порогового значения у больных с доброкачественными новообразованиями яичников.

Не установлено корреляционной зависимости между содержанием РЭФР и ЭФР-ПП в опухоли пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников.

Одновременно в опухоли 40 больных РЯ были определены РЭФР и ЭФР-ПП: в 14 (35%) опухолях маркеры не выявлены, в 10 (25%) обнаружены только ЭФР-ПП, в 9 (22,5%) – только РЭФР и в 7 (17,5%) – оба маркера.

Одновременно в 10 доброкачественных новообразованиях яичников исследовали частоту выявления РЭФР и ЭФР-ПП: в 6 (60%) из них выявлен фенотип РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$, в 3 (30%) – РЭФР$^+$ЭФР-ПП$^+$, в 1 (10%) наблюдении – РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^+$. Следовательно, для доброкачественных новообразований яичников был характерен рецепторный фенотип РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$ (60%), тогда как в РЯ такое сочетание выявлено только в 35% наблюдений.

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ РЭФР В ОПУХОЛИ ПАЦИЕНТОВ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ ЯИЧНИКОВ

Показатель	Новообразования яичников		p
	доброкачественные (n=12)	злокачественные (n=44)	
РЭФР не обнаружены	9 (75,0%)	27 (61,4%)	0,38
Медиана и пределы колебания РЭФР, фмоль/мг белка	11 (7,3–13)	40 (10–1120)	0,013
РЭФР >13 фмоль/мг белка	–	16 (36,4%)	0,01

Таблица 2

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЕ ЭФР-ПП В ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКОВ

Показатель	Новообразования яичников		p
	доброкачественные (n=10)	злокачественные (n=42)	
ЭФР-ПП не обнаружены	4 (40,0%)	19 (45,2%)	0,53
Медиана и пределы колебания ЭФР-ПП, пг/мг ДНК белка	269 (55,8–633)	244 (3,3–2323)	0,74
ЭФР-ПП >633 пг/мг ДНК	-	5 (11,9%)	0,25

Не установлено связи между содержанием РЭФР в опухоли и концентрацией СА-125 в сыворотке крови больных РЯ.

Не обнаружено корреляционной зависимости между возрастом больных с новообразованиями яичников и содержанием РЭФР и ЭФР-ПП в опухоли. Дисперсионный анализ также не выявил достоверных изменений в содержании РЭФР и ЭФР-ПП при увеличении возраста пациенток в обеих группах.

Не отмечено различий в содержании РЭФР и ЭФР-ПП в опухоли в зависимости от состояния репродуктивной функции, а также длительности постменопаузы. Так, значения РЭФР в опухоли при РЯ выше порогового уровня отмечены у 20% у больных с сохраненной репродуктивной функцией и 41,7% – у пациенток в постменопаузе; различия недостоверны (p=0,4).

У пациентов как с доброкачественными опухолями, так и при РЯ не установлено корреляционной зависимости между содержанием РЭФР и ЭФР-ПП в опухоли и максимальным размером новообразования.

У больных РЯ с одно- и двусторонним опухолевым поражением яичников частота выявления РЭФР была одинаковой (соответственно 40,0 и 37,9%), не различались и медианы этого маркера (37,5 и 36,5 фмоль/мг белка). Также не обнаружено различий в 2 группах пациенток в частоте выявления ЭФР-ПП при одностороннем (46,4%) и двустороннем (42,9%) РЯ. Медианы содержания ЭФР-ПП в РЯ не зависели от максимального размера опухоли и того, одно- или двусторонним было поражение.

Установлена достоверно бóльшая частота обнаружения РЭФР$^-$-опухолей яичников при I стадии РЯ (71,4%), чем у пациенток с большей распространенностью процесса (табл. 3). Необходимо отметить, что если при I–II стадиях РЯ частота выявления повышенных значений РЭФР (>13 фмоль/мг белка) составила 22,2% (у 2 из 9 больных), то при III–IV стадиях она возрастала до 40% (у 14 из 35; p=0,001).

Не обнаружено достоверных различий в содержании РЭФР в РЯ с учетом стадии заболевания (см. табл. 3).

Содержание ЭФР-ПП в РЯ не было достоверно связано со стадией заболевания, однако следует отметить снижение частоты ЭФР-ПП$^-$-опухолей по мере увеличения стадии заболевания: с 75% – при I стадии до 43,8% – при IV стадии (p=0,16; табл. 3).

Отмечена тенденция к снижению частоты выявления РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$-опухолей яичников по мере увеличения стадии заболевания. Так, частота выявления отрицательного РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$ фенотипа РЯ составила 50% (у 4 из 8 больных) при I–II стадиях, 37,5% (у 6 из 16) – при III стадии и 25,0% (у 4 из 16) – при IV стадии. При этом отмечено постепенное увеличение числа опухолей с фенотипом РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^+$ при разных стадиях заболевания: 12,5% (у 1 из 8 больных) при I–II стадиях, 18,8% (3 из 16 больных) – при III и 37,5% (6 из 16 пациенток) – при IV. Следует отметить, что такое сочетание маркеров не было характерно для доброкачественных новообразований яичников.

Изучена также связь между содержанием показателей РЭФР и ЭФР-ПП в опухоли у больных РЯ и критериями систем TNM и FIGO. Несмотря на то, что все наблюдавшиеся различия оказались статистически недостоверными, наиболее часто РЭФР$^-$-опухоли выявляли у больных без метастазов в регионарных лимфатических узлах (100%), а также при критерии T1 (75%).

Не установлено связи между содержанием ЭФР-ПП в опухоли больных РЯ и критериями TNM.

Показатели РЭФР в РЯ не зависели от наличия или отсутствия асцита. Недостоверно чаще (50%) выявляли отрицательный фенотип (РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$) опухоли у больных РЯ без асцита, чем с асцитом (24%).

Реже всего (55,6%) обнаруживали РЭФР$^-$-опухоли при серозном РЯ (для сравнения: при эндометриоидном – 80%, муцинозном – 100%). Уровень РЭФР в опухоли не зависел от гистологического варианта строения РЯ.

Таблица 3

СОДЕРЖАНИЕ РЭФР И ЭФР-ПП В ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ РЯ С УЧЕТОМ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Стадия РЯ	Число больных	РЭФР$^-$, n (%)	РЭФР медиана, пределы колебания, фмоль/мг белка	Число больных	ЭФР-ПП$^-$, n (%)	ЭФР-ПП медиана (пределы колебаний), пг/мг ДНК
I	7	5 (71,4)	33,5 32–35	8	6 (75,0)	1438 (553–2323)
II	2	1 (50,0)	9	2	–	264 (241–288)
III	19	11 (57,9)	47,5 15–293	16	10 (62,5)	86,8 (3,3–1588)
IV	16	10 (62,5)	31 14–1120	16	7 (43,8)	244 (19,3–2208)

Примечание. Для РЭФР – $p_{I–II,III,IV}$=0,001; для ЭФР-ПП – $p_{I–III,IV}$=0,16.

Частота выявления ЭФР-ПП$^-$-опухолей у больных серозным РЯ составила 51,5%, эндометриоидным – 80%, муцинозным – 50%. Отрицательный фенотип РЭФР$^-$ЭФР$^-$-опухолей обнаружен в 53,3% наблюдений (у 8 из 15 больных) при серозном РЯ и в 80% (у 4 из 5) – при эндометриоидном.

РЭФР$^-$-опухоли встречались среди высокодифференцированных РЯ в 81,8% случаев, умеренно дифференцированных – в 53,9%, низкодифференцированных – в 61,1%. Содержание РЭФР в опухоли не зависело от степени дифференцировки РЯ.

ЭФР-ПП$^-$-фенотип РЯ чаще выявляли в высокодифференцированных опухолях (70,0%), чем в умеренно (53,9%) и низкодифференцированных (47,1%), а наиболее высокая медиана содержания ЭФР-ПП (934 пг/мг ДНК) отмечена в умеренно дифференцированных РЯ (при высокодифференцированных опухолях – 241 пг/мг ДНК, низкодифференцированных – 244 пг/мг ДНК); различия недостоверны.

Следует отметить, что частота фенотипа опухолей яичников РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$ при высокой степени дифференцировки РЯ составила 60,0%, при умеренной – 27,3% и низкой – 29,4%. Кроме того, РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^+$ чаще выявляли при низкодифференцированном РЯ (35,3%), чем умеренно (18,2%) и высокодифференцированном (20,0%). В то же время для умеренно дифференцированных опухолях при РЯ был характерен фенотип РЭФР$^+$ЭФР-ПП$^-$ (36,4%) (для сравнения: при высокодифференцированных опухолях – 10,0%, при низкодифференцированных – 17,6%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, достоверно чаще РЭФР выявляли в злокачественных (40%), чем в доброкачественных эпителиальных опухолях яичников (25%). Выявленные показатели колебались в широких пределах (от 10 до 1120 фмоль/мг белка); медиана РЭФР была достоверно выше в опухолях при РЯ (40 фмоль/мг белка), чем в доброкачественных опухолях яичников (соответственно от 0 до 13; 11 фмоль/мг белка). Обнаружено, что уровень РЭФР не зависел достоверно от гистологического варианта РЯ, степени его дифференцировки, стадии заболевания, наличия асцита. При этом частота выявления отрицательного фенотипа РЯ по РЭФР$^-$ЭФР-ПП$^-$ при высокой степени дифференцировки РЯ составила 60%, при умеренной – 27,3%, низкой – 29,4%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л. На пути к пониманию природы рака // Биохимия. – 2008; 73 (5): 605–17.
2. Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований женских половых органов // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2009; 1–2: 76–85.
3. Герштейн Е.С., Бочарова Л.Б., Ермилова В.Д. и др. Рецепторы эпидермального фактора роста и их лиганды в карциномах эндометрия: связь с клинико-морфологическими факторами и рецепторами стероидов // Вопр. онкол. – 2000; 46 (2): 180–6.
4. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования рецепторов эпидермального фактора роста в опухолях человека // Клин. лаб. диагностика. – 1996; 1: 9–12.
5. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Современные представления о механизмах передачи сигналов факторов роста как основа эффективной молекулярно-направленной противоопухолевой терапии // Вопр. биол. мед. фарм. химии. – 2007; 1: 4–9.
6. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Давыдов М.И. Рецепторы семейства C-ERBB как мишени молекулярно-направленной противоопухолевой терапии: достижения, проблемы, перспективы // Мол. медицина. – 2010; 4: 5–10.
7. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2010; 21 (2) (Приложение 1): 160 с.
8. Имянитов Е.Н. Молекулярный патогенез карцином яичников. В кн.: «Диагностика и лечение рака яичников» (Под ред. В.А. Горбуновой) // М.: Издательство «Медицинское информационное агентство». – 2011; 15–28.
9. Карапетян В.Л., Степанова Е.В., Барышников А.Ю. и др. Экспрессия белка сосудистого эндотелиального фактора роста в ткани опухолей у больных раком яичника I–II стадий // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2010; 3: 73–76.
10. Карселадзе А.И. Клинико-морфологическая диагностика опухолей яичников // Архив патологии. – 2005; (Приложение): 7–63.
11. Киселев В.И., Лященко А.А. Молекулярные механизмы регуляции гиперпластических процессов // М. Компания «Димитрейд График Групп». – 2005; 346 с.
12. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. 3-е издание // М. Издательство «Мир»; БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009; 469 с.
13. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К. и др. Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2009; 3: 95–102.
14. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Молекулярная генетика рака яичников. Глава в кн.: «Практическая онкогинекология: избранные лекции» (Под ред. А.Ф. Урманчеевой, С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко) // Санкт-Петербург. «Центр ТОММ». – 2008; 313–9.
15. Barrett-Lee P. Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy // Endocr. Relat. Cancer. – 2005; 12 (Suppl. 1): 125–33.
16. Jemal A., Murray T., Samuels A. et al. Cancer statistics // CA Cancer. – 2003; 53: 5–26.
17. Miyamoto S., Hirata M., Yamazaki A. et al. Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor Is a Promising Target for Ovarian Cancer Therapy // Cancer Res. – 2004; 64: 5720–27.
18. Penson R. Рак яичников. Глава в «Руководстве по онкологии» (Под ред. Б.Э. Чебнера, Т.Дж. Линча, Д.Л. Лонго) // М.: «МЕДпресс-информ». – 2011; 517–31.
19. Schindlbeck C., Hantschmann P., Zerzer M. et al. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor 2, topoisimerase IIalpha, epidermal growth factor receptor, and nm23, expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2007; 17 (5): 1047–55.
20. Tainsky M.A. (Ed.). Tumor Biomarker Discovery. Methods and Protocol // Humana Press (New York, USA). – 2009; 332 p.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.33/.34-006.6-091.8

СТЕПЕНЬ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ И ПРОГНОЗ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

В.В. Делекторская, доктор медицинских наук,
Н.А. Козлов, **Г.Ю. Чемерис**, кандидат биологических наук
Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва
E-mail: delektorskaya@yandex.ru

Представлен ретроспективный клинико-морфологический анализ 60 случаев локализованных и метастатических нейроэндокринных опухолей (НЭО) различных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) для изучения корреляции пролиферативной активности опухолевых клеток с клинико-морфологическими параметрами и показателями выживаемости. Экспрессия Ki67 была оценена в первичных опухолях и их метастазах в лимфатических узлах и печени. Изучены морфологические особенности различных типов опухолей, включая НЭО G1 и G2, а также редкую группу НЭО G3. В результате проведенного исследования показано, что пролиферативная активность во вторичных очагах опухолевого роста может возрастать в процессе опухолевой прогрессии в 1,5–4,5 раза по сравнению с первичной опухолью. Достоверная взаимосвязь выявлена между показателями пролиферативной активности (экспрессией Ki67) и частотой развития отдаленных метастазов, размерами первичной опухоли и выживаемостью пациентов с НЭО ЖКТ. Таким образом, индекс пролиферации Ki67 является ключевым параметром морфологической диагностики НЭО ЖКТ, оценка которого в каждом месте развития опухолевого процесса имеет принципиальное значение для точного определения степени злокачественности, прогноза и особенностей лечения метастатических опухолей.

Ключевые слова: *нейроэндокринная опухоль, желудочно-кишечный тракт, пролиферативная активность, степень злокачественности, прогноз*

GRADE OF MALIGNANCY AND PROGNOSIS OF WELL-DIFFERENTIATED NEUROENDOCRINE TUMORS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

V.V. Delektorskaya, N.A. Kozlov, G.Yu. Chemeris
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

To study the correlation of proliferative activity of tumor cells with clinical and morphological parameters and indices of survival rates a retrospective clinical and morphological analysis of 60 cases of localized and metastatic neuroendocrine tumors (NETs) of the various parts of the gastrointestinal tract is presented. Ki67 expression was evaluated in primary tumors and their metastases in the lymph nodes and liver. Morphological features of different types of tumors, including NET G1 and NET G2, as well as the rare group of NET G3. As a result of the study it was shown that the proliferative activity in the secondary foci of tumor growth may increase during tumor progression in 1,5–4,5 times in comparison with the primary tumor. Significant interrelationship was found between indices of proliferative activity (expression of Ki67) and the incidence of the development of distant metastases, the size of the primary tumor and survival rate of patients with gastrointestinal NETs. Thus, proliferation index (expression of Ki67) is a key parameter of the morphological diagnostics of gastrointestinal NETs. The estimation of Ki67 proliferation index in the each site of the locations of the tumor process is critical for accurate determination of the grade of malignancy, prognosis, and features of treatment of metastatic tumors.

Key words: *neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract, proliferative activity, the grade of malignity, the prognosis*

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) представляют собой неоднородную группу эпителиальных новообразований, которые значительно различаются по биологическим характеристикам, клиническому течению и прогнозу [5, 8, 9]. Последняя классификация Всемирной организации здравоохранения (WHO, 2010) разделяет все НЭО ЖКТ с учетом степени дифференцировки на 2 основные группы: высокодифференцированные и низкодифференцированные нейроэндокринные новообразования [9]. Ключевым элементом морфологической диагностики является определение степени злокачественности с учетом индекса пролиферации (ИП) Ki67, позволяющее выделить 3 прогностические категории: опухоли низкой (G1), промежуточной (G2) и высокой (G3) степени злокачественности [1, 3, 5, 6]. Все высокодифференцированные неоплазии, независимо от того, имеют они относительно благоприятное течение или дают метастазы, называют НЭО и имеют

градацию G1 (Ki67 ≤3%) или G2 (Ki67 3–20%). Низкодифференцированные новообразования составляют отдельную группу высокоагрессивных опухолей, для обозначения которых используют термин «нейроэндокринный рак» и градацию G3 (Ki67 >20%). Эта группа включает новообразования мелко- и крупноклеточного типа.

Определение степени злокачественности и дальнейшее стадирование в соответствии с критериями TNM-системы позволяют стратифицировать НЭО ЖКТ в отношении их прогноза [8, 9]. Изучение патогенеза и молекулярно-генетических нарушений в нейроэндокринных неоплазиях свидетельствует о значительных различиях высоко- и низкодифференцированных вариантов данных опухолей и малой вероятности перехода одной формы в другую [8]. Однако, известно, что в высокодифференцированных НЭО часто отмечается гетерогенное распределение участков наивысшей пролиферативной активности [1, 2, 11]. При этом индекс Ki67 может со временем меняться, что отражается на степени злокачественности и прогнозе заболевания [7, 8, 12]. В этой связи большой интерес представляет детальная клинико-морфологическая характеристика группы НЭО G2, в рамках которой наблюдаются большие различия значений индекса Ki67 и вариантов клинического течения заболевания.

Целью настоящего исследования были оценка особенностей экспрессии Ki67 в клетках первичных и метастатических НЭО различных отделов ЖКТ и выявление взаимосвязи ИП с ключевыми клинико-морфологическими характеристиками и прогнозом заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены клинические данные и операционный материал, полученный у 60 пациентов с НЭО различных отделов ЖКТ, находившихся на хирургическом лечении в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 1994–2011 гг. Средний возраст больных на момент диагностики составил 53,7 года (от 19 до 78 лет), соотношение мужчин и женщин было – 0,67 (24 мужчины и 36 женщин).

Первичные опухоли ЖКТ были представлены НЭО желудка – в 18 случаях, подвздошной кишки – в 20, толстой кишки – в 13, двенадцатиперстной кишки – в 7, аппендикса – в 2 случаях. Размер первичных опухолей составлял 0,3 – 16,0 см (в среднем – 2,5 см). В общей группе у 42 (70,0%) больных на момент постановки диагноза имелись регионарные и(или) отдаленные метастазы со следующим распределением по стадиям: I – 4 (6,7%) пациента, II – 7 (11,7%), III – 22 (36,7%), IV – 27 (45,0%) (AJCC/UICC, 2009). Длительность послеоперационного наблюдения варьировала в пределах 6–255 мес. За это время у 2 (8,6%) пациентов выявлен локальный рецидив, у 14 (23,3%) обнаружены метахронные отдаленные метастазы. 14 (23,3%) больных умерли от прогрессирования заболевания; медиана общей (ОВ) и безрецидивной (БРВ) выживаемости составила соответственно 35 и 27 мес.

Ретроспективный анализ операционного материала включал только первичные НЭО ЖКТ (16 случаев), а также первичные и метастатические (синхронные и метахронные) очаги (44 случая). Диагноз в каждом случае был подтвержден на основе пересмотра гистологических препаратов и иммуногистохимического (ИГХ) исследования.

Среди основных морфологических параметров были исследованы: размеры первичного и метастатического очагов, степень гистологической дифференцировки, митотическая активность, локальная инвазия и прорастание окружающих органов, наличие внутрисосудистой и периневральной инвазии, очагов некроза, регионарных и отдаленных метастазов.

Во всех наблюдениях нейроэндокринная природа опухоли подтверждена с помощью ИГХ-окраски с антителами к хромогранину А и синаптофизину. Градация опухолей проведена на основании оценки гистологической структуры, митотической активности и индекса Ki67 в соответствии с критериями классификации WHO 2010 [9]. Случаи низкодифференцированного нейроэндокринного рака и смешанного адено-нейроэндокринного рака были исключены из исследования.

ИГХ-окрашивание выполнено на серийных парафиновых срезах ткани первичных и метастатических опухолей с использованием антител к Ki67 (MIB-1, Dako), хромогранину А (клон LK2H10, DBS), синаптофизину (клон Snp88, Biogenex) и в отдельных случаях – к CD56 (клон BC56C04, Biocare), панцитокератину (AE1/AE3, Dako), цитокератину 18 (клон DC10, Dako), D2-40 (клон D2-40, Dako), CD31 (клон BC2, BioCare), p53 (DO7, Biogenex), а также системы детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP (BioGenex). Депарафинизированные срезы обрабатывали в цитратном буфере pH 6,0 в водяной бане при 95°C в течение 40 мин. Результаты экспрессии маркеров оценивали 2 морфолога. Индекс Ki67 выражали как процент положительно окрашенных ядер опухолевых клеток в зонах наибольшей пролиферативной активности при учете 2000 клеток.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0 for Windows и Microsoft® Office Access 2007. Достоверность различий частот признаков в изучаемых группах определяли с использованием критерия χ^2 (различия считались статистически значимыми при $p<0,05$). Анализ прогностической значимости изучаемых параметров и построение кривых выживаемости проводили методом Каплана–Майера. Достоверность различий в выживаемости оценивали с помощью log-rank-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее частой локализацией первичных опухолей в исследованной группе, включающей 60 пациентов с НЭО различных отделов ЖКТ, были подвздошная кишка (20 случаев – 33,3%) и желудок (18 случаев – 30,0%). Регионарные и отдаленные метастазы НЭО преобладали в случае НЭО подвздошной кишки (соответственно 70,0 и 90,0%) и толстой кишки (69,2 и 53,8%). Клинико-морфологическая характеристика больных с НЭО ЖКТ с учетом анатомической локализации опухоли представлена в табл. 1.

Во всех наблюдениях новообразования характеризовались типичным для высокодифференцированных НЭО гистологическим строением и были представлены гнездными, трабекулярными и ацинарно-тубулярными структурами, сформированными мономорфными мелкими клетками со слабой степенью атипии (рис. 1, а). Сосудистая инвазия обнаружена в 36 (60,0%) случаях, периневральная инвазия – в 6 (10,0%), очаговые некрозы – 10 (16,7%). Строение метастатических очагов чаще полностью соответствовало первичной опухоли.

При ИГХ-исследовании первичные и метастатические НЭО диффузно экспрессировали хромогранин А, синаптофизин, панцитокератин AE1/AE3 и цитокератин 18 (рис. 1, б–в).

Первичные НЭО ЖКТ в 14 (23,3%) случаях были отнесены к НЭО G1 (Ki67 – 1–2%), в 41 (68,3%) – к НЭО G2 (Ki67 – 3–20%). В оставшихся 5 (8,3%) наблюдениях клетки НЭО демонстрировали пролиферативную активность (Ki67=25–35%), которая превышала пороговое для НЭО G2 значение. Эти опухоли были выделены в отдельную группу, обозначенную как «НЭО G3». Новообразования имели типичное органоидное или гнездное строение в сочетании с зонами солидного роста и демонстрировали диффузную экспрессию хромогранина А и синаптофизина. Ядерная экспрессия белка p53, типичная для низкодифференцированного рака, в клетках НЭО G3 отсутствовала.

Сравнительный анализ ИП клеток первичных опухолей и их метастазов в лимфатических узлах и печени (синхронных или метахронных) проводили в 40 наблюдениях. Среднее значение Ki67 в первичных НЭО ЖКТ, регионарных и отдаленных метастазах было равно соответственно 5,8, 9,2 и 12,3%. При сопоставлении с первичными НЭО обнаружено увеличение пролиферативной активности клеток в метастазах в 1,5–4,5 раза в 9 (22,5%) случаях. Наиболее часто ИП менялся в НЭО G2 подвздошной кишки, имеющих значения Ki67 в первичных опухолях, равные 4–6%. Так, в одном из случаев индекс Ki67 в первичной опухоли составлял 6%, в метастазе в лимфатическом узле – 25%, в печени – 27% (рис. 1, г–е). В результате повышения ИП в метастазах в 6 (15,0%) наблюдениях выявлено изменение степени злокачественности НЭО: в 3 случаях градация опухоли в первичном очаге соответствовала G1, а в метастазах в печени – G2, и в 3 случаях в первичном очаге – G2, а в метастазах в лимфатических узлах и печени – G3. Только в одном наблюдении НЭО G2 двенадцатиперстной кишки отмечалось снижение ИП в метастазах.

С учетом максимального показателя пролиферативной активности клеток первичных и метастатических очагов опухолевого роста нейроэндокринные неоплазии ЖКТ были классифицированы как НЭО G1 (Ki67 – 1–2%) в 11 (18,3%) наблюдениях, НЭО G2 (Ki67 – 3–20%) – в 41 (68,3%) и НЭО G3 (Ki67 – 21–35%)– 8 случаях (13,3%).

При сравнении пролиферативной активности в группах локализованных и метастатических НЭО значительно более высокая экспрессия Ki67 была выявлена у больных, опухоли у которых сопровождались развитием метастазов (p=0,012). Средний ИП составил 7,2% в группе больных без метастазов и 16,9% – метастазами. Обнаружена статистически достоверная положительна связь между высоким уровнем Ki67 и размером первичной опухоли (критерием pT по системе TNM; p=0,010). Мы не нашли различий в экспрессии Ki67 в зависимости от лока-

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА СЛУЧАЕВ НЭО ЖКТ С УЧЕТОМ АНАТОМИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Анатомическая локализация	Число больных			Возраст, интервал (средний), годы	Средний размер опухоли, см	Наличие метастазов, %	
	всего	мужчины	женщины			регионарных	отдаленных
	n (%)						
Желудок	18 (30,0)	10 (55,6)	8 (44,4)	19–71 (53,0)	4,9	7 (38,9)	0
Двенадцатиперстная кишка	7 (11,7)	3 (42,9)	4 (57,1)	37–61 (51,0)	4,7	3 (42,9)	2 (28,5)
Подвздошная кишка	20 (33,3)	4 (20,0)	16 (80,0)	24–73 (56,1)	2,9	14 (70,0)	18 (90,0)
Аппендикс	2 (3,3)	1 (50,0)	1 (50,0)	50–78 (64,0)	2,7	1 (50,0)	1 (50,0)
Толстая кишка	13 (21,7)	6 (46,2)	7 (53,8)	36–67 (50,9)	3,6	9 (69,2)	7 (53,8)
Всего	60 (100)	24 (40,0)	36 (60,0)	19–78 (52,5)	3,8	34 (100)	28 (100)

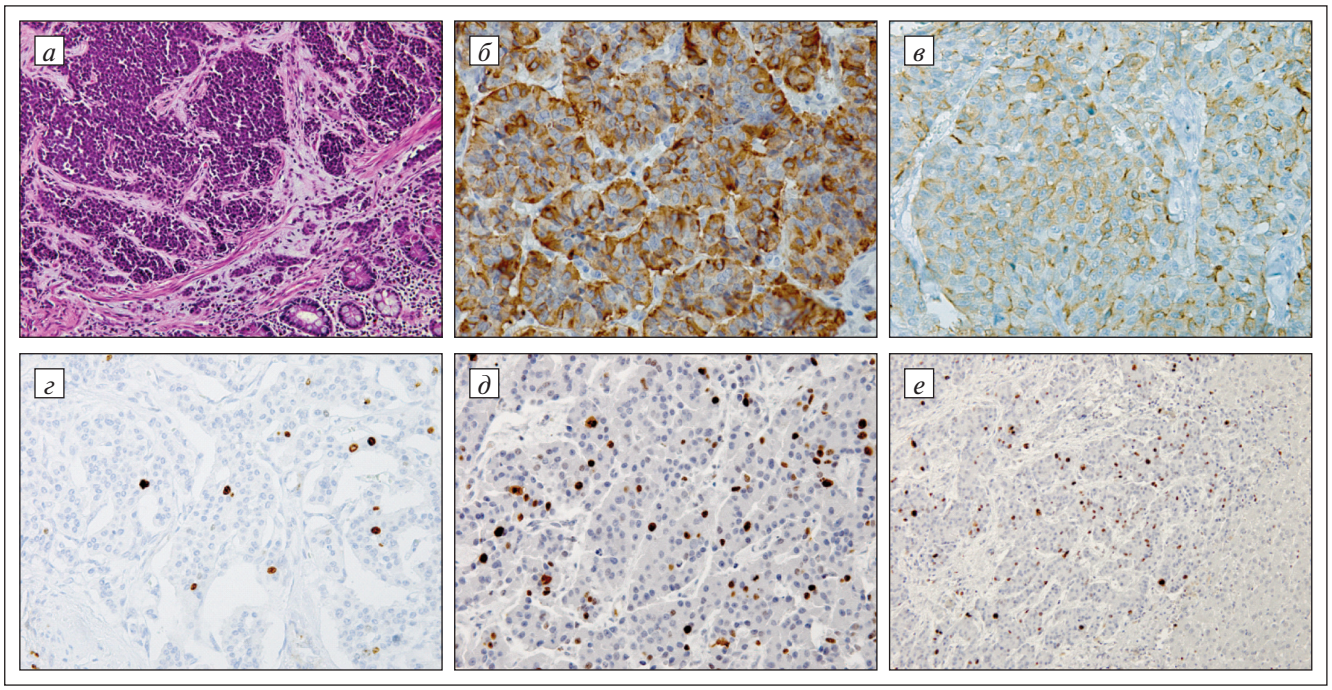


Рис. 1. *НЭО тонкой кишки: а – гнездное строение первичной опухоли (×200), окраска гематоксилином и эозином; б – ИГХ-экспрессия хромогранина А в клетках первичной опухоли (×400); в – ИГХ-экспрессия синаптофизина в клетках метастаза в печени (×400); г – индекс Ki67=6% в клетках первичной опухоли (×250); д – индекс Ki67=25% в клетках метастаза в лимфатическом узле (×400); е – индекс Ki67=27% в клетках метастаза в печени (×250), ядра клеток докрашены гематоксилином Майера*

лизации, наличия нейро-, сосудистой или местной инвазии, а также регионарных метастазов. Частота развития как регионарных, так и отдаленных метастазов увеличивалась в опухолях более высокой степенью злокачественности (табл. 2). Отмечалась достоверная связь частоты развития отдаленных метастазов НЭО ЖКТ со степенью злокачественности опухоли (p=0,01) и средними значениями Ki67 (p=0,024).

Общая 5-летняя выживаемость больных с НЭО низкой и промежуточной степени злокачественности составили соответственно 87 и 38%. За период наблюдения у 2 (18,1%) больных с НЭО G1 развились отдаленные метастазы (медиана ОВ и БРВ соответственно 47 и 30 мес). У 21 (51,2%) больного с НЭО G2 отмечено прогрессирование заболевания (медиана ОВ и БРВ – 38 и 27 мес). В группе НЭО G3 отдаленные метастазы и местный рецидив развились у 5 (62,5%) больных (медиана ОВ и БРВ – 31 и 27 мес).

Для анализа прогностической значимости ИП в пределах группы G2 опухоли были разделены на 4 подгруппы с учетом значения Ki67: 1-я – 3–5%; 2-я – 6–10%; 3-я – 11–15%; 4-я – 15–20%. Повышенная экспрессия Ki67 (>15%) в ядрах опухолевых клеток сочеталась с низким показателем 3-летней ОВ и БРВ (соответственно 33 и 16%) и было статистически значимо связано с худшим прогнозом, чем в других подгруппах (p=0,005; (рис. 2, а–б). Достоверные различия между группами G2 и G3 были выявлены только для ОВ и БРВ больных с НЭО желудка (p=0,001; рис. 2, в–г).

Таблица 2

НАЛИЧИЕ РЕГИОНАРНЫХ И ОТДАЛЕННЫХ МЕТАСТАЗОВ НЭО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ОПУХОЛИ

Тип опухоли	Число больных (n=60)	Больные с метастазами	
		регионарными (n=34)	отдаленными (n=30)
G1	11 (18,3)	4 (36,4)	3 (27,3)
G2	41 (68,3)	22 (53,7)	21 (51,2)
G3	8 (13,3)	8 (100)	6 (75,0)

Примечание. В скобках – %.

Изучение выживаемости в метастатической группе НЭО в зависимости от ИП продемонстрировало обратную взаимосвязь индекса Ki67 с показателем ОВ в группе с метастазами (p=0,002). Средние значения Ki-67 в метастазах были достоверно выше, чем в соответствующих первичных метастатических НЭО ЖКТ (p=0,0; рис. 3, а–б).

Определение злокачественного потенциала НЭО ЖКТ являет-

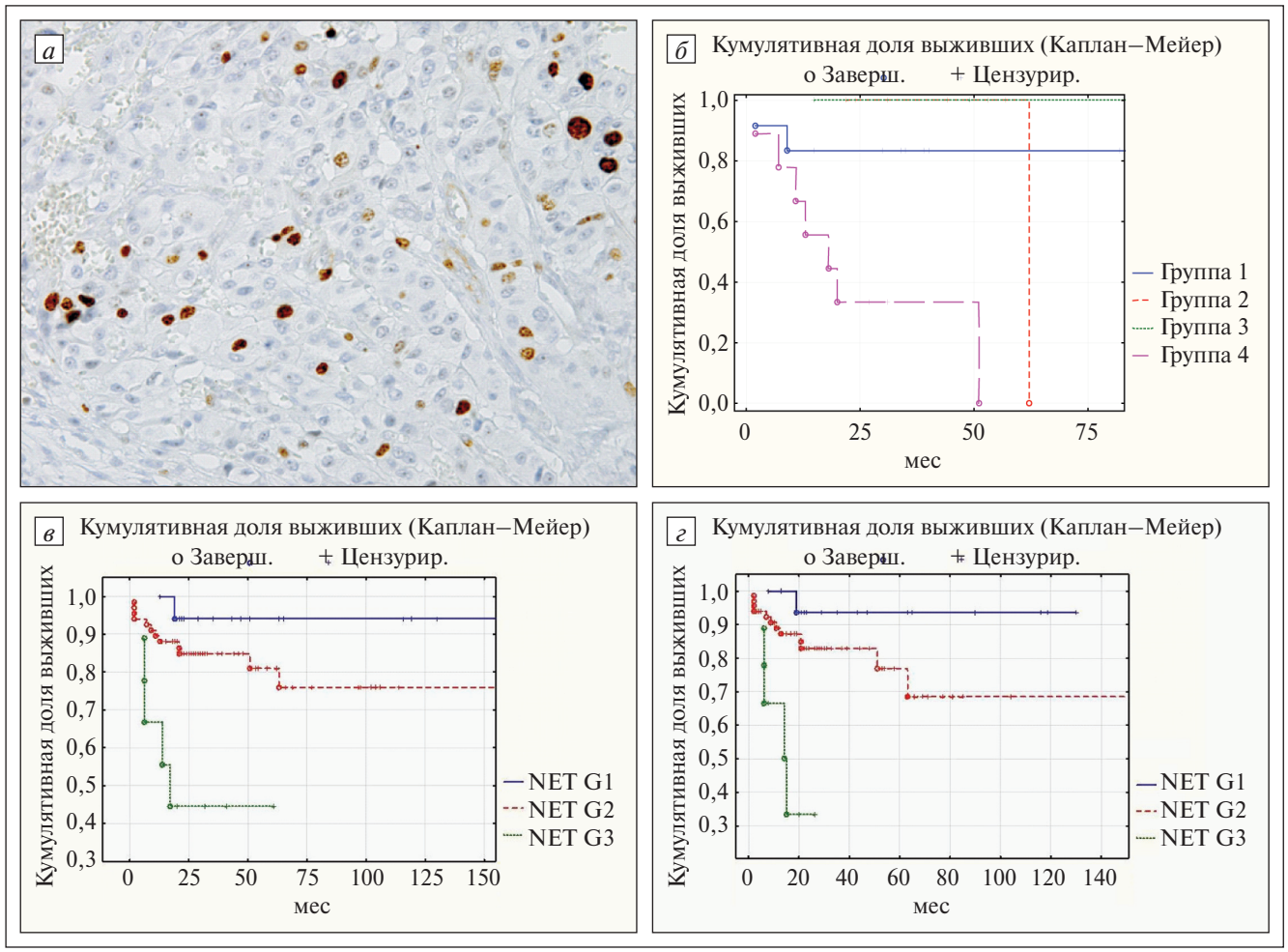


Рис. 2. *Выживаемость больных в зависимости от ИП НЭО ЖКТ: а – экспрессия Ki67 в НЭО толстой кишки равна 15%; б – ОВ в зависимости от ИП (4-я группа – Ki67 >15%); в–г – соответственно ОВ и БРВ при НЭО желудка в зависимости от степени злокачественности опухоли*

ся сложной диагностической проблемой и основой для оценки прогноза заболевания и получения оптимальных результатов при лечении данной патологии. Принимая во внимание, что более 60% больных. НЭО ЖКТ имеют метастазы на момент постановки диагноза, большое значение имеет уточнение степени злокачественности метастатических форм опухолей и изучение факторов, влияющих на их клиническое течение [8].

В результате проведенного исследования установлено, что пролиферативная активность во вторичных очагах опухолевого роста может возрастать в процессе опухолевой прогрессии в 1,5–4,5 раза по сравнению с первичной опухолью. Полученные данные подтверждают возможность перехода метастазов НЭО G1 в НЭО G2, а также трансформации со временем метастазов НЭО G2 в НЭО G3 [13, 14]. Аналогичные результаты получены в ряде морфологических исследований при изучении серии первичных НЭО G1-G2 поджелудочной железы и в единичных работах, посвященных исследованию высокодифференцированных НЭО тубулярного ЖКТ [4, 10, 11, 13, 14].

Значительно более высокая экспрессия Ki67 выявлена у больных, опухоли которых сопровождались развитием отдаленных метастазов (p=0,012) и имели высокий критерий pT по системе TNM (p=0,010). Средний индекс Ki67 составил 7,2% в группе больных без метастазов и 16,9% – в группе с метастазами. НЭО ЖКТ промежуточной степени злокачественности значительно различались по агрессивности течения и метастатическому потенциалу. Наиболее низкие показатели ОВ и БРВ наблюдались при Ki67 >15% и были статистически значимо связаны с худшим прогнозом заболевания (p=0,005). Кроме того, индекс Ki67 в 13,3% случаев НЭО ЖКТ превышал 20-процентный пороговый уровень, составляя 25–35%. Данный тип опухолей был отнесен к градации G3 в соответствии с фракцией пролиферации, но не гистологической структурой и степенью дифференцировки, и по прогнозу достоверно отличался от НЭО G2 при опухолях, локализованных в желудке (p=0,001). На основе анализа материала метастатических опухолей показано также, что индекс Ki-67 находится в обратной взаимосвязи с ОВ в группе с метастазами (p=0,002).

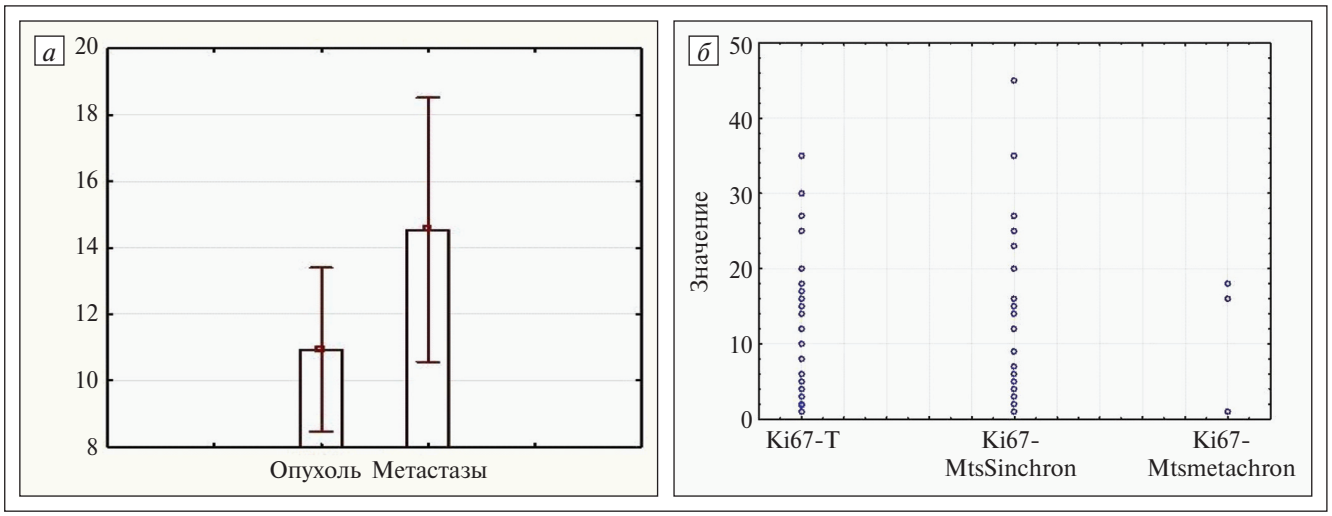


Рис. 3. *Сравнение ИП в первичных НЭО ЖКТ и в метастазах: а – средние значения Ki67 в первичных метастатических НЭО и соответствующих метастазах (тест Вилкоксона, p=0,000); б – распределение индекса Ki67 в метастатических НЭО, а также их синхронных и метахронных метастазах*

Таким образом, индекс пролиферации Ki67 является ключевым параметром морфологической диагностики НЭО ЖКТ, оценка которого в каждом из участков развития опухолевого процесса имеет принципиальное значение для точного определения степени злокачественности, прогноза и особенностей лечения метастатических опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amarapurkar A., Davies A., Ramage J. et al. Proliferation of antigen MIB-1 in metastatic carcinoid tumours removed at liver transplantation: relevance to prognosis // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2003; 15: 139–43.
2. Couvelard A., Deschamps L., Ravaud P. et al. Heterogeneity of tumor prognostic markers: a reproducibility study applied to liver metastases of pancreatic endocrine tumors // Mod Pathol. – 2009; 22 (2): 273–81.
3. Cunningham J., Grimelius L., Sundin A. et al. Malignant ileocecal serotonin-producing carcinoid tumors: the presence of a solid growth pattern and/or Ki67 index above 1% identifies patients with a poorer prognosis // Acta Oncol. – 2007; 46: 747–56.
4. Dhall D., Mertens R., Bresee C. et al. Ki-67 proliferative index predicts progression-free survival of patients with well-differentiated ileal neuroendocrine tumors // Hum Pathol. – 2012; 43 (4): 489–95.
5. Hochwald S., Zee S., Conlon K. et al. Prognostic factors in pancreatic endocrine neoplasms: An analysis of 136 cases with a proposal for low grade and intermediate-grade groups // J. Clin. Oncol. – 2002; 20: 2633–42.
6. Hotta K., Shimoda T., Nakanishi Y. et al. Usefulness of Ki-67 for predicting the metastatic potential of rectal carcinoids // Pathol. Int. – 2006; 56: 591–96.
7. Jamali M., Chetty R. Predicting Prognosis in Gastroentero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors: An Overview and the Value of Ki-67 Immunostaining // Endocr Pathol. – 2008; 19: 282–88.
8. Klimstra D., Modlin I., Adsay N. et al. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: Application of the Delphic Consensus process to the development of a minimum pathology data set // Am. J. Surg. Pathol. – 2010; 34: 300–13.
9. Rindi G., Arnold R., Bosman F.T. et al. Nomenclature and classification of NENs of digestive system // in Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. (eds.): WHO Classification of tumors of the digestive system. IARC: Lyon. – 2010; 13–14.
10. Kasajima A., Pavel M., Darb-Esfahani S. et al. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours // Endocr. Relat. Cancer – 2011; 18 (1): 181–92.
11. Lindholm E., Lyons J. 3rd, Anthony C.T. et al. Do primary neuroendocrine tumors and metastasis have the same characteristics? // J. Surg. Res. – 2012; 174 (2): 200–6.
12. Strosberg J., Nasir A., Coppola D. et al. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors // Hum. Pathol. – 2009; 40: 1262–8.
13. Tang L., Shia J., Vakiani E. et al. High grade transformation of differentiated neuroendocrine neoplasms of the enteropancreatic system – a unique entity distinct from de novo high grade neuroendocrine carcinoma in pathogenesis and clinical behavior // Mod. Pathol. – 2008; 21 (Suppl): 137A.
14. Tang L., Song L., Shia J. et al. Grade progression of well differentiated neuroendocrine tumors of the enteropancreatic system is distinct from poorly differentiated high grade neuroendocrine carcinomas // Mod. Pathol. – 2010; 23 (Suppl.): 133A.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.24-006.6-091.8:577.21

МУТАЦИИ *EGFR* И *KRAS*, ВАЖНЫЕ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Н.Н. Мазуренко, доктор биологических наук, профессор,
И.В. Цыганова, кандидат биологических наук, **И.М. Гагарин**, кандидат медицинских наук,
Ю.В. Чуев, **В.В. Мочальникова**, **А.А. Коломейцева**, кандидат медицинских наук,
В.А. Горбунова, доктор медицинских наук, профессор

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

E-mail: nnmazurenko@mail.ru

В последние годы достигнуты успехи в лечении ряда онкологических заболеваний тирозинкиназными ингибиторами (ТКИ). Молекулярно-нацеленная (таргетная) терапия немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) ингибиторами EGFR – гефитинибом и эрлотибом эффективна только у пациентов с соматическими мутациями гена EGFR. Проведен анализ мутаций в 18, 19 и 21 экзонах EGFR в опухолевой ДНК 214 пациентов с НМРЛ, включая 186 аденокарцином. Мутации обнаружены у 29% (54/186) больных аденокарциномой, достоверно чаще – у женщин (p=0,0006) и некурящих (p=0,0002). В 19 экзоне EGFR выявлены делеции ^{746}ELREA^{750}, в 21 экзоне – точечные замены L858R, в 18 экзоне мутации в кодонах G719 и E709. Кроме того, в 19 экзоне обнаружены мутации «non-ELREA», значение которых для таргетной терапии при НМРЛ изучено недостаточно. Мутации KRAS являются маркером резистентности НМРЛ к лечению ингибиторами тирозинкиназ. Мутации во 2 экзоне KRAS обнаружены в 11% аденокарцином, чаще – у мужчин и курильщиков, повышена частота замен G12C. Таким образом, спектр мутаций EGFR и KRAS у некурящих и курильщиков НМРЛ различается. Анализ мутаций необходим для индивидуализации терапии НМРЛ ингибиторами тирозинкиназ.

Ключевые слова: *НМРЛ, тирозинкиназные ингибиторы, мутации EGFR, KRAS*

EGFR AND KRAS MUTATIONS IMPORTANT FOR NON-SMALL CELL LUNG CANCER TARGET THERAPY

N.N. Mazurenko, I.V. Tsyganova, I.M. Gagarin, I.V. Chuev, V.V. Mochalnikova, A.A. Kolomeytseva, V.A. Gorbunova
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Last successful results in target therapy of cancer were achieved with different tyrosine kinases inhibitors (TKI). Target therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC) with EGFR inhibitors gefitinib and erlotinib is effective only in patients with somatic mutations in EGFR gene. We have studied mutations in 18, 19 and 21 exons of EGFR in tumor DNA from 214 NSCLC patients, including 186 adenocarcinomas (ADC). Mutations were found in 29% (54/186) ADCs, more frequently in women (p=0,0006), predominantly in non-smokers (p=0,0002). There were ^{746}ELREA^{750} deletions in exon 19, point mutation L858R in exon 21 and mutations in codons G719 and E709 in exon 18 of EGFR. Besides, we have revealed «non-ELREA» mutations in EGFR exon 19, which had uncertain clinical significance. TKI therapy is non-effective in NSCLC patients with KRAS mutations. Mutations in KRAS exon 2 were found in 11% of ADC, more frequently in men and smokers, the frequency of G12C mutations was elevated. Thus the EGFR/KRAS mutation spectrums differed in never smokers and heavy smokers NSCLC patients. Analysis of EGFR/KRAS mutations is necessary for individualization of TKI therapy in NSCLC patients.

Key words: *NSCLC, tyrosine kinase inhibitors, EGFR, KRAS mutations*

Рак легкого остается самой частой причиной смерти от злокачественных новообразований в мире. В России заболеваемость раком легкого занимает 1-е место у мужчин и 9-е – у женщин; ежегодно регистрируется 63 тыс. новых случаев [1]. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет 85% всех случаев рака легкого, наиболее распространены аденокарцинома (30–45%) и плоскоклеточный рак (25–40%). Эти гистологические варианты рака различаются по онкогенезу, клиническому течению и молекулярно-генетическим характеристикам, что получило отражение в различных вариантах лекарственной терапии НМРЛ.

В последнее десятилетие разработаны новые, более эффективные схемы и режимы терапии НМРЛ, которые направлены на максимальную индивидуализацию лечения пациентов. Активно внедряются современные противоопухолевые таргетные препараты, направленные на ингибирование ключевых сигнальных путей в опухолевой клетке. Одной из таких мишеней является рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который акти-

вирован во многих опухолях человека. Активация EGFR происходит вследствие различных типов мутаций либо амплификации гена. В 30–75% случаев НМРЛ иммуногистохимически выявляется гиперэкспрессия EGFR в результате амплификации гена либо эпигенетических изменений (гиперактивация транскрипции), чаще в плоскоклеточном раке легкого [2].

Для лечения НМРЛ применяют разные варианты таргетной терапии. Таргетный препарат цетуксимаб (Эрбитукс) (моноклональные антитела против лигандсвязывающего домена EGFR) продемонстрировал эффективность в клинических исследованиях в сочетании со стандартной платиносодержащей химиотерапией для лечения НМРЛ при гиперэкспрессии EGFR.

Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназного домена EGFR (ТКИ) – эрлотиниб (Тарцева) и гефитиниб (Иресса), были одобрены в 2003–2004 гг. как препараты 2-й и 3-й линии для лечения прогрессирующего НМРЛ после химиотерапии на основе препаратов платины. Клинический опыт показал, что стабильные ответы на терапию ТКИ коррелируют с соматическими мутациями гена *EGFR*, затрагивающими тирозинкиназный домен рецептора [3, 4]. Результаты рандомизированных международных клинических исследований показали значительное преимущество гефитиниба и эрлотиниба по сравнению с комбинированной химиотерапией с препаратами платины в качестве 1-й линии лечения больных аденокарциномой легкого с IIIB и IV стадиями заболевания при наличии мутации *EGFR* [3].

В настоящий момент в России гефитиниб (Иресса) показан к применению для лечения НМРЛ в 1 линии при наличии мутации EGFR и для лечения во 2 линии терапии при неизвестном статусе EGFR. Препарат эрлотиниб (Тарцева) показан к применению для лечения НМРЛ в 1 линии при наличии мутации EGFR и для лечения во 2 линии вне зависимости от мутантного статуса EGFR.

В опухолях легкого выявлено более 30 различных соматических мутаций в гене *EGFR*, которые затрагивают 75 аминокислотных сайтов, спектр мутаций зависит от популяции. ТКИ подавляют активность рецептора EGFR при мутациях в 18, 19 и 21 экзонах гена *EGFR* [4–6]. Наиболее распространены делеции, затрагивающие область ELREA (аминокислотные остатки 746–750) в экзоне 19, и точковые мутации в кодоне L858R (L861R) в экзоне 21. На долю этих мутаций приходится более 90% всех нарушений структуры тирозинкиназного домена EGFR. Показано, что эффективность терапии ТКИ существенно выше у пациентов с делецией в 19 экзоне, чем с заменой в 21 экзоне [5]. Ответ на ТКИ наблюдается также при точковых мутациях кодона G719 в экзоне 18, которые составляют 3–5% мутаций гена *EGFR*. Вставки без сдвига рамки считывания и точковые мутации в экзоне 20, в основном замены T790M, составляют 5% от мутаций *EGFR* и половину мутаций, которые обусловливают устойчивость опухолей к терапии ингибиторами *EGFR* [6].

Мутации *EGFR* характерны для аденокарциномы легкого и особенно для аденокарциномы с бронхиолоальвеолярным компонентом [4, 6, 7]. Мутации *EGFR* являются ранним событием в канцерогенезе рака легкого и не связаны со стадией болезни и прогрессией заболевания. Многочисленные исследования показали, что частота мутаций *EGFR* зависит от расовой принадлежности, статуса курения и пола пациента [8, 9]. Мутации *EGFR* обнаруживают более чем в 30% случаев НМРЛ у жителей Восточной Азии и лишь в 10% НМРЛ у европейцев и пациентов на других континентах. Частота мутации *EGFR* в аденокарциноме легкого достигает 30–38% у пациентов в западных странах и 65–70% – в Юго-Восточной Азии [8, 9].

Наиболее часто мутации *EGFR* встречаются в аденокарциноме у некурящих [4, 5, 9]. Рак легкого у некурящих составляет 25% случаев рака легкого в мире (10–15% – в западных странах) и занимает 7-е место среди причин смерти от онкологических заболеваний. Доля рака легкого у некурящих составляет более 50% случаев рака у женщин в Восточной Азии и только 2–6% – у мужчин в западных странах [9]. Самая высокая частота мутаций *EGFR* определяется в аденокарциноме легкого у некурящих женщин в Юго-Восточной Азии (до 70%).

Делеции в 19 экзоне и однонуклеотидные замены в 20 и 21 экзонах, кодирующих тирозинкиназный домен *EGFR*, при НМРЛ взаимно исключают мутации других генов, в частности *KRAS* [4, 10 Поэтому наличие мутации *KRAS* в аденокарциноме легкого фактически может быть маркером неэффективности лечения ТКИ. Мутации *KRAS* являются маркером негативного прогноза при различных онкологических заболеваниях. При раке легкого мутации *KRAS* чаще встречаются в аденокарциноме, однако прогностическая роль мутаций *KRAS* при НМРЛ недостаточно ясна [8]. Известно, что частота мутаций *KRAS* в НМРЛ варьирует в пределах 15–41% у пациентов в США и Европе и значительно ниже (0–17%) в аденокарциноме у пациентов в странах Азии [4, 5, 9].

Сегодня мутации *EGFR* являются необходимым клиническим маркером, позволяющим предсказать и оценить эффективность терапии НМРЛ ТКИ [3]. Поэтому при лечении НМРЛ ТКИ назначают только после выявления мутации *EGFR*. Поскольку ТКИ вошли в практику лечения НМРЛ в России [11, 12], представлялось важным оценить частоту и спектр мутаций генов *EGFR* и *KRAS* у российских пациентов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 214 больных НМРЛ, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2008–2013 гг., которым предполагалась терапия ТКИ.

Большинство из 214 опухолей легкого имели железистую дифференцировку: у 186 пациентов (86,9%) была аденокарцинома легкого, из них у 9 (4,2%) – аденокарцинома с бронхиолоальвеолярным компонентом. У 6 (2,8%) пациентов был смешанный рак легкого с участками железистой дифференцировки: железисто-плоскоклеточный рак (у 4), железисто-крупноклеточный (у 1) и железисто-нейроэндокринный (у 1). У 16 (7,5%) пациентов был плоскоклеточный рак легкого, у 2 – крупноклеточный рак. Кроме того, были исследованы редкие гистологические типы НМРЛ: аденокистозный (у 3) и мукоэпидермоидный (у 1). Среди больных НМРЛ превалировали (56,5%) мужчины и пациенты в возрасте 50–70 лет, хотя 16 (7,5%) больных НМРЛ были моложе 40 лет. Большинство пациентов (76,2%) никогда не курили (табл. 1). Препараты ДНК получали с помощью протеиназы К из опухолевых клеток, собранных после макродиссекции парафиновых срезов операционных биопсий НМРЛ (203), или из биопсий при бронхоскопии (7) и цитологических препаратов (3). Для определения мутации в 18–21 экзонах гена *EGFR* и во 2 экзоне гена *KRAS* проводили амплификацию ДНК в полугнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ПЦР-продуктов [12].

Таблица 1

ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ НМРЛ, ПРОШЕДШИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

Клиническая характеристика	Число больных, n (%)
Пол:	
мужчины	121(56,5)
женщины	93 (43,5)
Средний возраст, годы:	
мужчины	57 (28–84)
женщины	55 (24–77)
Гистологический тип НМРЛ:	
аденокарцинома	186 (86,9)
плоскоклеточный рак	16 (7,5)
крупноклеточный рак	2 (0,9)
железисто-плоскоклеточный рак	4 (1,9)
железисто-крупноклеточный рак	1 (0,5)
железисто-нейроэндокринный	1 (0,5)
аденокистозный	3 (1,4)
мукоэпидермоидный	1 (0,5)
Отношение к курению:	
курят	38 (17,7)
бросили курить	13 (6,1)
некурящие	163 (76,2)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мутации в 19 экзоне *EGFR* обнаружены у 28 из 186 (15%) больных аденокарциной легкого, что составило 15%, в том числе у 2 больных с бронхиолоальвеолярным компонентом. Все мутации находятся вблизи сайта связывания АТФ – лизина К745. У 25 пациентов выявлены типичные делеции кодонов 746–750, кодирующие пептид ^{746}ELREA^{750} в АТФ-связывающей петле тирозинкиназного домена, что приводит к изменению позиции аминокислот и конститутивной активации рецептора EGFR. В 5 случаях делеции сопровождались заменой аминокислот в белке EGFR. Выявлены делеции, которые, помимо ^{746}ELREA^{750}, включают кодоны 751T и 752S, а также делеция 9 аминокислот Del 746E–754K (табл. 2).

У 3 больных аденокарциномой легкого обнаружены редкие мутации, так называемые «non-ELREA», которые могут быть выявлены только секвенированием и не обнаруживаются другими методами [13]. Мутация Del 750A-756N была установлена у курящей женщины, что подтверждает сообщения о необычном спектре мутаций *EGFR* у курильщиков [5, 9, 14]. Мутации Del 751T-755A и Del 753P-757K выявлены

Таблица 2

МУТАЦИИ В 19-М ЭКЗОНЕ EGFR В АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО

Мутация 19 экзона EGFR	Обозначение мутации	Кол-во
Нормальный аллель …KIPVAIK^{746}ELREA^{750}TSPKANKEILD		
Простые делеции		
…KIPVAIK – - – – -TSPKANKEILD…	Del 746E-750A	8
…KIPVAIK- – - - – –- - – ANKEILD…	Del 746E-754K	1
…KIPVAIKE – – - TSPKANKEILD…	Del 747L-750A	1
…KIPVAIKE- – - –- -SPKANKEILD…	Del 747L-751T	7
…KIPVAIKE- – - - - -PKANKEILD…	Del 747L-752S	2
Делеции с точечными заменами		
…KIPVAIK- – - – *Q*TSPKANKEILD…	Del (746E-750A) insQ	1
…KIPVAIK- – - –- *A*SPKANKEILD…	Del (746E-751T) insA	1
…KIPVAIK – - – - - - *V*PKANKEILD…	Del (746E- 752S) insV	1
…KIPVAIKE- – - –- *A*SPKANKEILD…	Del (747L-751T) insA	1
…KIPVAIKE- – - –- - *A*PKANKEILD…	Del (747L-752S) insA	1
Делеции «non-ELREA»		
…KIPVAIKELRE- – –- – – -KEILD…	Del 750A-756N	1
…KIPVAIKELREA-– - –- NKEILD…	Del 751T-755A	1
…KIPVAI*KELREA*TS- -- - – EILD…	Del 753P-757K	1
Дупликация …KIPVAI*KIPVAIK*ELREATSPKANKEILD	Dupl 740I-745	1

у некурящих женщин с аденокарциномой легкого, причем последняя пациентка на терапию ТКИ не ответила (сообщение Коломейцевой А.А.), возможно, из-за того, что мутация лежит вне домена ^{746}ELREA^{750}. Кроме того, у некурящей пациентки с брохиолоальвеолярным компонентом обнаружена дупликация 6 кодонов Dupl 740I-745K в 19 экзоне *EGFR*. Дупликации в 19 экзоне *EGFR* – очень редкие мутации при НМРЛ [4], значение которых для эффективности терапии ТКИ изучено мало. Первые данные указывают на чувствительность аденокарцином легкого к ТКИ при наличии дупликации в 19 экзоне *EGFR* [15].

Мутации в 21 экзоне *EGFR*, типичная замена лейцина на аргинин L858R выявлены у 23 пациентов с аденокарциномой (10,7%), в том числе у 2 с бронхиолоальвеолярным компонентом. Кроме того, у 2 курящих пациентов с НМРЛ обнаружены мутации в 853 кодоне *EGFR*: у пациента с низкодифференцированной аденокарциномой легкого установлена замена изолейцина на аспарагин I853N, а у больного с крупноклеточной анапластической карциномой выявлена silent-мутация I853I без замены аминокислоты. Поскольку эти мутации ранее не описаны и данных о лечении пациентов НМРЛ с такими мутациями нет, мы не учитывали мутации I853 в общей сумме мутаций *EGFR*.

У 3 из 186 (1,6%) больных аденокарциномой выявлены мутации в 18 экзоне *EGFR*: 2 точковые замены в кодоне G719 и редкая мутация в кодоне E709 – делеция с инсерцией Del(709E-710T)insD. У части пациентов с такими мутациями наблюдался ответ на терапию ТКИ [4, 6, 16]. При анализе ДНК 106 пациентов НМРЛ мутация T790M в 20 экзоне *EGFR*, обеспечивающая резистентность к терапии ТКИ, обнаружена не была.

Суммарно мутации в *EGFR* выявлены в 25,2% (54/214) НМРЛ и в 29% (54/186) аденокарциномы легкого, включая 4 из 9 случаев (44%) аденокарциномы с бронхиолоальвеолярным компонентом, что коррелирует с данными другого российского исследования [17]. В смешанных опухолях легкого с железистой дифференцировкой мутации не обнаружены. Доля делеций 19 экзона составила 51,8% (28/54), доля мутации в 21 экзоне – 42,6% (23/54) и доля мутации в 18 экзоне – 5,5% всех мутаций гена *EGFR*. Как показано, чувствительность к ТКИ (гефитинибу) отличается у больных с мутациями 21 и 19 экзонов *EGFR*: лучший ответ отмечен у больных с мутациями 19 экзона, что связывают с различным ингибированием сигнальных путей [5, 15]. Очевидно, что наблюдаемая высокая частота мутаций *EGFR* в исследуемой группе пациентов с НМРЛ связана с особенностями выборки: у преобладающего большинства пациентов была аденокарцинома легкого.

Из 214 пациентов НМРЛ когда-либо курили 51 (23,8 %), а среди 186 больных аденокарциномой легкого – 42 (23,1%). Мутации *EGFR* обнаружены у 35,4% некурящих и у 7,1% куривших когда-либо пациентов с аденокарциномой легкого (табл. 3). Таким образом, среди пациентов с аденокарциномой легкого и мутациями *EGFR* доминируют некурящие – 94% (51/54). Мутации в гене *EGFR* у больных аденокарциномой женщин встречались достоверно чаще (41,4%), чем у мужчин (18,2%; p=0,0006). Однако среди некурящих пациентов мутации выявлены у 41,7% женщин и 26,7% мужчин, различие недостоверно (p=0,08), что подтверждает литературные данные [4]. Частота мутаций *EGFR* в аденокарциноме легкого у когда-либо куривших мужчин – 5,1%, что соответствует литературным данным для европеоидов [9].

Как известно, мутации в экзоне 2 (замены в кодонах G12 и G13) составляют 93–95% всех мутаций *KRAS*. При анализе мутаций гена *KRAS* в 214 образцах ДНК НМРЛ мутации в 2 экзоне выявлены в 10,7% (23/214) НМРЛ: в 21 (11,3%) случае аденокарциномы и 2 (12,5%) случаях плоскоклеточного рака легкого. В группе больных аденокарциномой с мутацией *KRAS* преобладали мужчины (57%) и некурящие (67%). Невысокая частота мутаций *KRAS*, возможно, объясняется тем, что большинство пациентов не курили. Из 144 некурящих пациентов с аденокарциномой мутации *KRAS* выявлены у 14 (9,7%), что превышает частоту мутаций *KRAS* у некурящих пациентов с аденокарциномой легкого из западных стран (0–4%) [7, 15].

Таблица 3

ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ МУТАЦИЙ *EGFR* ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ЛЕГКОГО ОТ ПОЛА И СТАТУСА КУРЕНИЯ

Пациенты с аденокарциномой легкого (n=186)	Пациенты с мутацией *EGFR*		p
	абс.	%	
Пол			
женщины (n=87)	36	41,4	0,0006
мужчины (n=99)	18	18,2	
Статус курения			
некурящие (n=144)	51	35,4	0,0002
курившие когда-либо (n=42)	3	7,1	
Некурящие			
женщины (n=84)	35	41,7	0,08
мужчины (n=60)	16	26,7	
Курившие когда-либо			
женщины (n=3)	1	33,3	0,2
мужчины (n=39)	2	5,1	

Все мутации *KRAS* представляли собой замены в кодоне G12: G12D (35%), G12C(22%), G12V(17%), G12A(13%), G12S(9%), G12R(4%). Обращает на себя внимание высокая частота замен глицина на цистеин G12C и валин G12V, что является результатом трансверсии (замены пурина на пиримидин G>T) и характерно для мутаций, образующихся вследствие экспозиции полициклическим ароматическим углеводородам сигаретного дыма. Трансверсии в кодоне G12 *KRAS* обнаружены у 67% (6/9) курящих и 29% (4/14) некурящих пациентов НМРЛ. Это коррелирует с данными, согласно которым спектр мутаций *KRAS* различается у курильщиков и некурящих; частота трансверсий выше у курильщиков [8–10, 14, 18]. Мутация G12C *KRAS* – самая частая у больных НМРЛ; выживаемость таких больных до прогрессирования при терапии ТКИ достоверно хуже, чем у пациентов НМРЛ с другими мутациями *KRAS*, тогда как общая выживаемость достоверно не различалась [18].

Суммируя полученные данные, можно заключить, что мутации гена *EGFR* выявлены у 29% российских больных с аденокарциномой легкого и чаще встречаются у женщин (p=0,0006). Мутации *EGFR* обнаружены у 35,4% некурящих, но ограничиваться только анализом указанных мутаций *EGFR* у больных аденокарциномой и некурящих нельзя, так как они встречаются и у куривших когда-либо пациентов (7,1%). Мутации *KRAS* выявлены у 11% больных аденокарциномой, чаще – у мужчин. Всего мутации *EGFR* и *KRAS* выявлены у 46% больных аденокарциномой легкого, при этом частота и спектр мутаций различаются у курильщиков и некурящих.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для индивидуализации терапии больных раком легкого необходимы полный клинический анамнез, точное гистологическое субтипирование опухолевого образца и его молекулярно-генетический анализ для определения активированных онкогенов. Успехи таргетной терапии последних лет, открытие новых молекулярных мишеней (ALK, ROS и др.) и их ингибиторов дают основание полагать, что дальнейшие генетические исследования позволят продолжить индивидуализацию терапии с целью достижения максимального эффекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2012; 22 (Прил. 1; № 3): 54–61.
2. Soria J.C., Mok T.S., Cappuzzo F., Pasi A.J. EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: Current trends and future prospects // Cancer treatment reviews – 2012; 38: 416–430.
3. Azzoli C., Baker S., Temin S. et al. American society of clinical oncology practice guideline update of chemotherapy for stage IV non-small cell lung cancer // J. Clin Oncol. – 2009; 23: 5622.
4. Kosaka T., Yatabe Y., Endoh H. et al. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications // Cancer Research. – 2004; 64: 8919–23.
5. 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.
6. 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 Research. – 2006; 12 (240): 7222–31.
7. Li A., Chitale D., Riely G. 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.
8. El-Telbany A., Ma P. Cancer Genes in Lung Cancer // Genes Cancer. – 2012; 3 (7–8): 467–80.
9. Couraud S., Zaicman G., Milleron B. Et al. Lung cancer in never smokers – A review // Eur. J. Cancer. – 2012; 48 (9): 1229–31.
10. Pao W., Wang T., Riely G. et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib // PLOS medicine 2005; 2 (1): e17, 57–61.
11. Моисеенко В.М., Проценко С.А., Семенов И.И., и др. Применение Ирессы (гефитиниба) в качестве терапии первой линии для лечения неоперабельных аденокарцином легкого, содержащих мутацию в гене *EGFR* // Современная онкология. – 2010; 1: 60–66.
12. Коломейцева А.А., Гагарин И.М., Мочальникова В.В. и др. Эффективность ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) у больных распространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011; 22 (1): 42–48.
13. Емельянова М.А., Мазуренко Н.Н., Гагарин И.М. и др. Определение мутаций в гене *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого с помощью биологических микрочипов // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2012; 23 (3): 42–8.
14. Takamochi K., Oh S., Suzuki K. Different *EGFR/KRAS* mutation spectrum in lung cancer between never smokers and heavy smokers // J. Clin. Oncol. – 2012; 30 (abstr 10548).
15. 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): 1790–1797.
16. 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: 3812–3821.
17. Демидова И.А., Баринов А.А., Савелов Н.А. и др. Исследование молекулярно-генетических нарушений у больных аденокарциномой легких. // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2012; 2: 28–34.
18. Fiala O., Pesek M., Finek J. et al. The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer // Cancer Genet. – 2013; 06 (1–2): 26–31.

© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 615.277.3.099.076.9

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ДИИНДОЛИЛМЕТАНА

В.М. Друх[1], кандидат медицинских наук,
М.А. Пальцев[2], доктор медицинских наук, академик РАН,
В.И Киселев[1], доктор биологических наук, член-корреспондент РАМН,
И.Н. Кузнецов[3], кандидат биологических наук,
Л.А. Ашрафян[4], доктор медицинских наук, член-корреспондент РАМН,
Е.Л. Муйжнек[5], кандидат биологических наук,
О.И. Пчелинцева[1]

[1]Российский университет дружбы народов,
[2]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
[3]«Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ,
[4]Российский научный центр рентгенорадиологии МЗ РФ,
[5]Закрытое акционерное общество «МираксБиоФарма», Москва

E-mail: pchelintseva87@mail.ru

Проведено доклиническое экспериментальное изучение токсических и аллергизирующих свойств фармацевтической композиции дииндолилметана в различных дозировках. Установлено, что исследуемый препарат относится к V классу токсичности (практически нетоксичные лекарственные вещества) и не оказывает аллергизирующего действия.
Ключевые слова: *: токсичность, доклинические исследования, дииндолилметан*

THE STUDY OF TOXIC AND ALLERGENIC PROPERTIES OF THE NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF DIINDOLYLMETHANE

V.M. Druh[1], M.A. Paltcev[2], V.I. Kiselev[1], I.N. Kuznetsov[3], L.A. Ashrafyan[4], E.L. Muyjnek[5], O.I. Pchelintseva[1]
[1]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation, [2]National Research centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation, [3]Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russian Federation, [4]Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russian Federation, [5]CJSC «MiraxBiopharma», Moscow, Russian Federation

Preclinical experimental study of toxic and allergenic properties of new pharmaceutical composition of diindolylmethane was carried on in various doses. It was established that tested drug refers to toxicity class V (almost non-toxic pharmaceutical substance) and has no allergenic activity.
Key words: *toxicity, preclinical study, diindolylmethane*

ВВЕДЕНИЕ

Перед изучением возможности применения любого лекарственного средства (ЛС) у человека необходимо проведение тщательных доклинических испытаний. Основным разделом доклинического исследования ЛС является изучение его токсических эффектов на животных. Правилами надлежащей лабораторной практики и Хельсинкской декларацией оговариваются нормы для изучения токсичности нового ЛС либо субстанции. Чем тщательнее изучена токсичность на животных, тем меньше нежелательных реакций может возникнуть при клинических испытаниях [1].

В результате токсикологического изучения появляется информация о возможности дальнейшего использования исследуемого вещества, устанавливаются возможные побочные эффекты, диапазон доз и формулируются ограничения в применении нового ЛС.

С учетом постоянно возрастающей смертности населения от онкологических заболеваний перспективным направлением является поиск природных и синтетических противоопухолевых соединений, способных остановить развитие предраковых состояний.

В связи с этим была разработана новая фармацевтическая композиция с противоопухоле-

вым действием, в состав которой входит дииндолилметан. В условиях *in vitro* микромолярные концентрации дииндолилметана эффективно подавляли пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, а также их способность образовывать сосуды. *In vivo* введенный подкожно экспериментальным животным дииндолилметан (в дозе 5 мг/кг, ежедневно) на 74% подавлял патологический неоангиогенез [3, 4]. Помимо антипролиферативного и антиангиогенного действия, дииндолилметан способен подавлять местные воспалительные реакции, которыми нередко сопровождаются гипер- и неопластические процессы в гормонально-зависимых органах и тканях, а также индуцировать апоптотические процессы клеток с опухолевыми свойствами.

В связи с высокой противоопухолевой активностью дииндолилметана разработка и изучение препаратов на его основе является одной из актуальных задач современной фармакологии.

Целью экспериментального исследования было изучение на грызунах общей и специфической токсичности, а также аллергизирующих свойств новой фармацевтической композиции. Данные исследования позволили выявить наиболее чувствительные к веществу ткани и оценить переносимость и безопасность применения изучаемой фармацевтической композиции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование острой токсичности проведено на 156 белых нелинейных мышах и крысах (самцы и самки в возрасте 3 мес), изучение субхронической токсичности – на 200 крысах, аллергизирующих свойств – на 36 морских свинках. До начала исследования животные были случайным образом распределены на группы в зависимости от принимаемой дозы препарата. Группы были однородными по отсутствию у животных внешних признаков заболеваний и массе тела (±20%).

Перед проведением исследований всех животных содержали на 30-дневном карантине, во время которого грызунов осматривали дважды в день. Животные, не соответствующие установленным критериям, были исключены из исследования в период карантина.

Исследуемая фармацевтическая композиция («Инфемин») состояла из активного вещества – 3,3 дииндолилметана и вспомогательных компонентов, обеспечивающих его биодоступность.

Всем лабораторным животным препарат вводили внутрижелудочно через атравматичный металлический зонд. Точность дозирования достигалась изменением вводимого объема. Введение осуществляли медленно. Контрольные животные получали аналогичный объем растворителя – растительное масло.

Изучаемый диапазон доз в пересчете на дииндолилметан для исследования острой токсичности составил от 100 до 5000 мг/кг с последующим наблюдением в течение 14 сут. Для изучения субхронической токсичности препарат вводили ежедневно на протяжении 90 дней в 3 дозах: минимальной – 10 мг/кг; предполагаемой максимальной – 1000 мг/кг и промежуточной – 100 мг/кг в пересчете на дииндолилметан.

Для оценки возможного развития анафилактического шока (в индексах по Weigle) препарат вводили морским свинкам в дозах 10 мг/кг и 1000 мг/кг в пересчете на дииндолилметан в течение 5 дней. Через 14 дней после окончания введения препарата всем опытным и контрольным животным внутрибрюшинно была введена разрешающая доза препарата в виде водной эмульсии 100 мг/кг дииндолилметана.

Статистическую значимость различий между группами рассчитывали для количественных данных с помощью критерия Стьюдента, для бинарных данных – с применением критерия Фишера. Средние летальные дозы рассчитывали по В.Б. Прозоровскому [2]. Высокие дозы достигались повторными введениями препарата с интервалом 15 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После введения препарата группы, в которых исследовали острую токсичность, не различались по массе животных, количеству потребляемой воды и пищи. Животные опытной группы (получавшие препарат) по поведению и внешнему состоянию не отличались от контрольных. Половых различий в гибели животных при внутрижелудочном введении дииндолилметана не зарегистрировано.

В ходе проведенных исследований установлено, что вводимый препарат ни в одной из групп не вызвал летальных исходов (табл. 1, 2). По данным вскрытия и макроскопического исследования, острое внутрижелудочное введение фармацевтической композиции в изучаемых дозах мышам и крысам того и другого пола не вызывал макроскопических изменений внутренних

Таблица 1

ЛЕТАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ

Пол	Доза в пересчете на активный компонент, мг/кг			
	100	300	500	1000
Самцы	0/6	0/6	0/6	0/6
Самки	0/6	0/6	0/6	0/6

Таблица 2

ЛЕТАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ

Пол	Доза в пересчете на активный компонент, мг/кг						
	100	300	500	1000	1500	3000	5000
Самцы	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Самки	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Примечание. В числителе – летальный исход, в знаменателе – всего животных (здесь и в табл. 2).

Таблица 3

ВЛИЯНИЕ ДИИНДОЛИЛМЕТАНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕЛЫХ КРЫС ЧЕРЕЗ 90 ДНЕЙ (M±M)

Показатель	Основная группа	Контрольная группа	Доза дииндолилметана		
			минимальная (10 мг/кг)	максимальная (1000 мг/кг)	промежуточная (100 мг/кг)
Гемоглобин, г/л	142±3	138±3	139±1	145±4	141±5
Гематокрит	0,43±0,2	0,43±0,2	0,41±0,14	0,43±0,15	0,39±0,24
Эритроциты, •1012/л	7,6±0,6	7,5±0,4	7,9±0,2	7,7±0,5	6,6±0,4
Цветовой показатель, пг	19,1±0,5	20,5±0,5	20,3±0,4	21,3±0,7	19,2±0,2
Объем эритроцитов, фл	58,4±0,4	56,2±0,4	57,3±0,5	58,4±0,3	59,8±0,5
СОЭ, мм/ч	4,5±0,5	4,7±0,4	4,2±0,4	4,5±0,5	4,5±0,4
Тромбоциты, •109/л	625±25	635±20	659±20	606±23	649±26
Лейкоциты, •109/л	20,2±1,2	19,9±1,0	19,2±1,3	18,3±1,0	19,0±1,6
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,09	0,4±0,08	0,4±0,09
Сегментоядерные нейтрофилы, %	12,7±1,1	12,2±1,1	11,9±1,0	12,9±1,3	13,7±1,1
Базофилы, %	0	0	0	0	0
Эозинофилы, %	2,3±0,3	2,1±0,5	2,2±0,3	2,3±0,2	2,2±0,2
Моноциты, %	2,4±0,3	2,1±0,5	2,8±0,2	2,4±0,2	2,7±0,3
Лимфоциты, %	77±1,0	77±0,5	76±0,4	76±1,0	63±3
Плазматические клетки, %	0,3±0,09	0	0	0,2±0,09	0,2±0,09
Продолжительность свертывания, с	48,7±2,7	46,0±2,8	46,9±2,1	45,6±2,7	46,1±3,0

и эндокринных органов, головного мозга, а также слизистой оболочке желудка и кишечника.

Проведенные исследования показали, что изучаемая фармацевтическая композиция при остром введении экспериментальным животным практически не оказывала токсического действия.

Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после острого введения позволяют отнести изучаемую фармацевтическую композицию к V классу: практически нетоксичные ЛС.

С учетом невысокой токсичности препарата, показанной в остром эксперименте, для оценки субхронической токсичности был установлен срок наблюдения 90 дней. Выбор регистрируемых показателей определялся требованиями нормативных документов для государственной регистрации новых фармацевтических веществ.

В результате экспериментального внутрижелудочного введения фармацевтической композиции грызунам не отмечено ее негативного влияния на биохимические параметры крови, что свидетельствует об относительной безвредности препарата (табл. 3).

Для изучения аллергизирующих свойств фармацевтической композиции была оценена возможность развития анафилактического

шока после внутрижелудочного введения композиции морским свинкам обоего пола. У всех животных, получавших препарат в изучаемых дозах, не выявлено признаков даже умеренного шока.

ВЫВОДЫ

1. В ходе эксперимента установлено, что изучаемая фармацевтическая композиция на основе дииндолилметана («Инфемин») относится к V классу токсичности (практически нетоксичные лекарственные вещества).

2. В ходе изучения острой токсичности гендерных различий в группах не обнаружено.

3. Исследование субхронической токсичности также показало хорошую переносимость изучаемого препарата.

4. Препарат не обладает аллергизирующими свойствами.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют признать перспективной дальнейшую разработку препарата с последующим проведением доклинических исследований фармацевтической активности.

Научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы выполняются в ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» в рамках исполнения комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства «Производство лекарственных средств на основе биотехнологий для лечения социально-значимых заболеваний», финансируемого Министерством образования и науки Российской Федерации в соответствии с постановлением Правительства РФ №218.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. – М., 2008.
2. Прозоровский В.Б. // Фармакология и токсикология. – 1978; 4: 497–502.
3. Chang X., Tou J., Hong C. et al. 3,3′-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice // Carcinogenesis. – 2005; 264 (4): 771–8.
4. McCarty M.F., Block K.I. Multifocal angiostatic therapy: an update // Integrative Cancer Therapies. – 2005; 4 (4): 301–14.

ВСПЫШКА АТИПИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ В САУДОВСКОЙ АРАВИИ ПРОДОЛЖАЕТСЯ

К Саудовской Аравии, где отмечено несколько случаев атипичной пневмонии, по-прежнему прикован интерес вирусологов и эпидемиологов: в начале мая одна пациентка, 69-летняя женщина, заболевшая 25 апреля, скончалась. Еще двое – мужчины 48 лет и 81 года остаются в критическом состоянии. Четвертый пациент – 56-летний мужчина, заболевший 7 мая, выздоровел и выписан из больницы. У всех 4 имелись многочисленные хронические заболевания, сообщает ВОЗ. На 16 мая в Саудовской Аравии зарегистрировано в общей сложности 26 случаев заболевания атипичной пневмонией, в том числе 15 – со смертельным исходом. Роспотребнадзор рекомендовал воздержаться от поездок в эту страну. Вместе с тем исследователи пытаются получить больше информации о новом коронавирусе MERS-CoV, ранее известном как hCoV-EMC. В Саудовской Аравии ведутся работы по секвенированию вируса. В США и Великобритании активизирована разработка серологического теста, направленного на идентификацию антител к вирусу.

С сентября 2012 г. вирус hCoV-EMC вызвал 40 случаев заболевания, включая 20 – со смертельным исходом. Эпидемиолог из Оксфордского университета клинических исследований П. Хорби полагает, что вспышка 2012 г. могла быть вызвана использованием контаминированного инструментария для бронхоскопии и интубации трахеи, проводившихся больным с респираторным синдромом. С этого времени был обнаружен и исследован рецептор к вирусу, который располагается на стенке клеток эпителия дыхательных путей. Пока не ясно, аналогичен ли этот вирус вызвавшему вспышку SARS в начале 2000-х годов, когда заболели более 8000 человек и погибли более 750. Возможно, это новый вирус, и только эпидемиологические данные покажут, насколько он способен к передаче от человека к человеку.

Nature. – 2013; 495: 251–4.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ МОЖЕТ УСКОРИТЬ ОТВЕТ НА ПАНДЕМИЮ ГРИППА

Новый штамм вируса гриппа, H7N9, погубивший 35 человек в Китае и вызвавший заболевание почти 100 человек, вновь поставил вопрос о том, насколько быстро могут отреагировать разработчики и производители вакцин на появление новых штаммов гриппа. Вакцина должна быть достаточно эффективной и производиться в достаточном количестве для прекращения вспышки и предотвращения ее распространения на другие регионы. Ученые группы Novartis по разработке вакцин и диагностических наборов из Кембриджа (Массачусетс, США) заявили, что ими разработан метод, позволяющий в кратчайшие сроки произвести синтетическую вакцину на основе секвенирования генома вируса, опубликованного онлайн.

Sci Transl Med. – 2013; 5 (185): 185–68.

КЛОНИРОВАНИЕ УСПЕШНО ПРИМЕНЕНО ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ученые из Орегоны сообщили, что им удалось успешно клонировать человеческие клетки для получения эмбриональных стволовых клеток. Это позволит разработать метод выращивания тканей и органов, способных заменить «износившиеся» и пораженные заболеванием, а в перспективе – выращивать «в пробирке» клонированных младенцев.

Для экспериментов были взяты клетки кожи ребенка с генетической патологией. Они были слиты с донорской яйцеклеткой, которая затем начала делиться с развитием генетически идентичного эмбриона. После 8-месячного периода развития из этого эмбриона были выделены стволовые клетки.

Метод, идентичный использованному для клонирования широко известной овечки Долли, был разработан Ш. Миталиповым, который родился в Алма-Ате в 1961 г., окончил Тимирязевскую сельскохозяйственную академию в Москве, затем аспирантуру Медико-генетического научного центра РАМН. Докторскую диссертацию защитил в Институте генетики человека. С 1995 г. Ш. Миталипов работает в США; он является профессором в Орегонском национальном центре по изучению приматов, а также профессором Центра стволовых клеток, кафедры гинекологии и акушерства, кафедры молекулярной и медицинской генетики и кафедры педиатрии в Орегонском университете науки и здоровья (США).

Профессор Миталипов первым в мире клонировал приматов – макак Мито и Тракер. В сентябре 2010 г. Комитет по клиническим испытаниям (США) предоставил профессору Миталипову лицензию на проведение экспериментов с человеческими яйцеклетками и эмбрионами. Миталипов считает, что ничего антигуманного или неэтичного в его работах нет, и что эта технология не предполагает рождение клонированных детей.

Католическая церковь отрицательно относится к экспериментам такого рода: кардинал Бостона Sean O'Malley назвал эксперименты по клонированию человека аморальными, даже если они проводятся с терапевтической целью, поскольку в этом случае «ученые используют человека как продукты, произведенные для того, чтобы удовлетворять желания других людей».

Эмбриональные стволовые клетки в настоящее время получают из абортивного материала, при этом, естественно, они генетически не идентичны клеткам больных, нуждающихся в пересадке органов и тканей. Ш. Миталипов предполагает, что при помощи разработанной им методики, опубликованной в журнале Cell, можно будет получать ткани, генетически идентичные тканям реципиента.

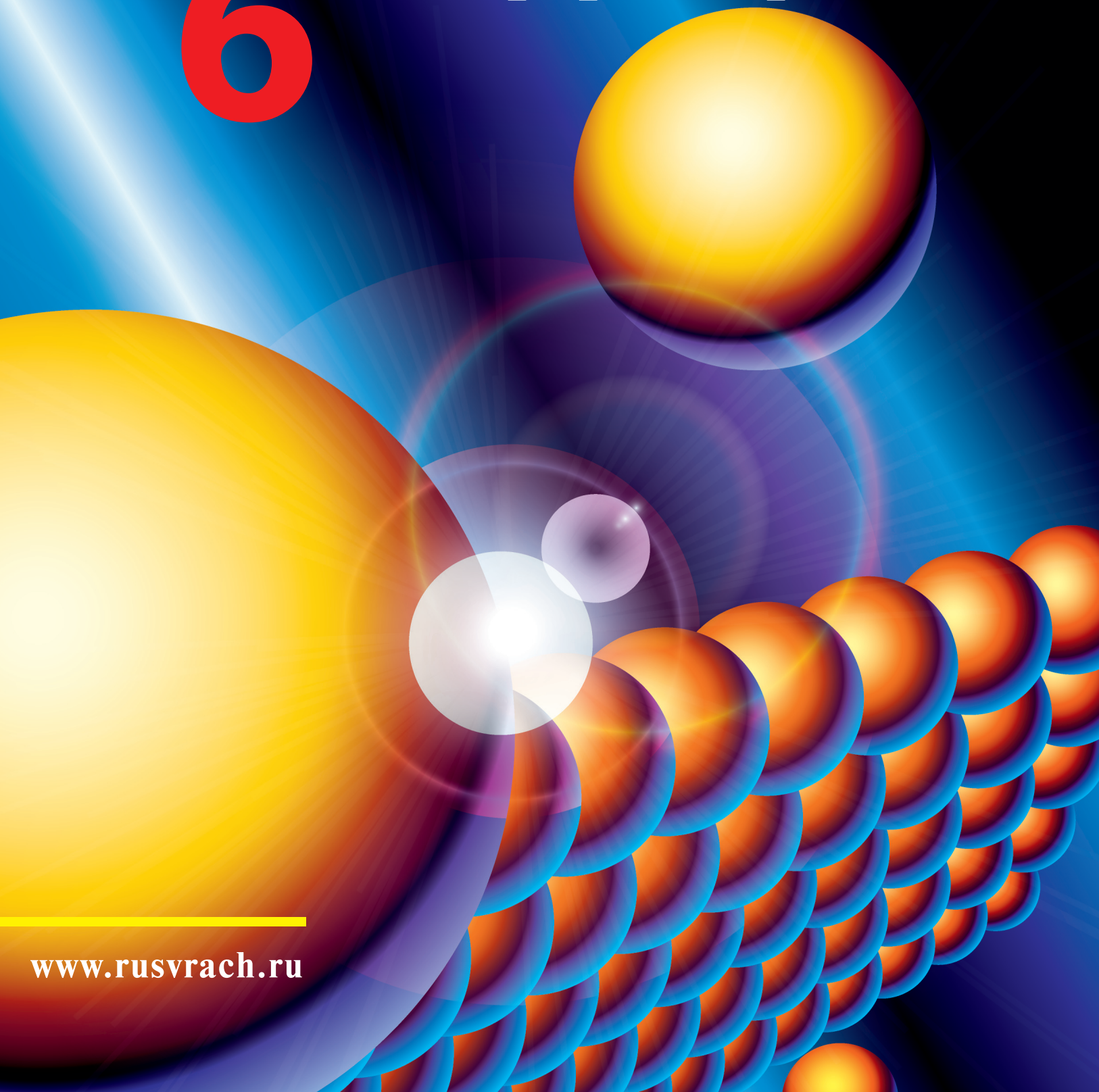
Cell. – 2013; 15: 1–11.

ISSN 1728-2918

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА

2013
6



www.rusvrach.ru