

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



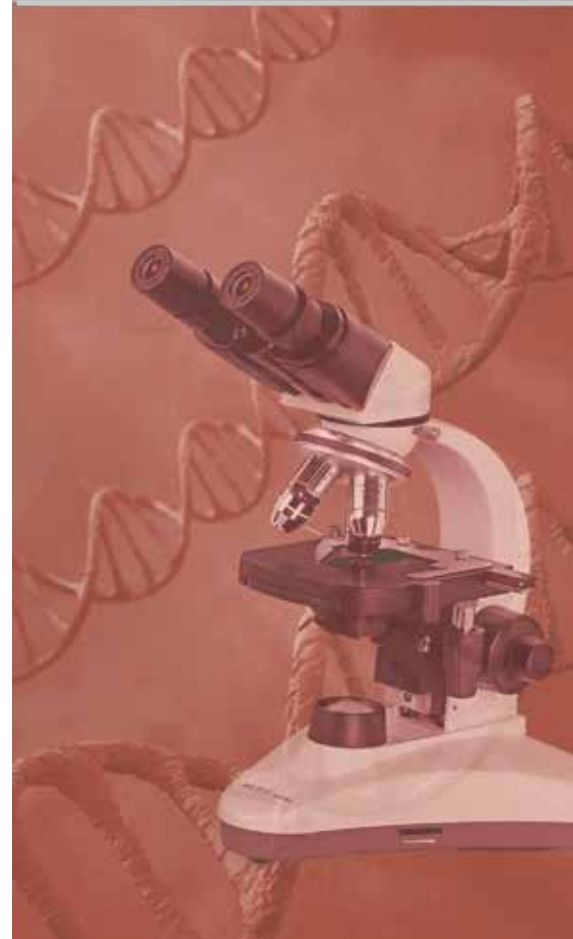
*Феномен РНК-интерференции
в онкологии: достижения,
проблемы и перспективы*

*Белки мембранных микродоменов
и их участие в онкогенезе*

*Вторые первичные опухоли
у онкологических больных:
эпидемиология, лекарственный
канцерогенез*

*Морфологическая классификация
нейроэндокринных новообразований
пищеварительной системы:
современное состояние проблемы
и нерешенные вопросы*

ТОМ 3 № 3
2016





microtesty.ru

Микротесты б.м.в.

ООО «МИКРОТЕСТЫ В БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ»



поставки качественных реактивов:

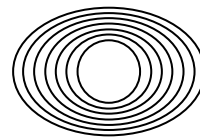
- антитела для диагностики и научных исследований,
- зонды для FISH, CISH,
- микроРНК зонды,
- расходные материалы, буферы для гистологии, ИГХ, гибридизации in situ,
- системы детекции Nichirei (для работы с тканями человека, мышь, крысы),
- положительные контрольные стекла, отрицательные контрольные сыворотки для решения широкого спектра задач по выявлению, мониторингу и прогнозированию опухолей, исследованию опухолевого метастазирования, дифференциальной опухолевой диагностике, идентификации вирусов и пр.

С 2014 г. журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Якубовская Марианна Геннадиевна, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гудкова Маргарита Владимировна, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

3 ТОМ 3
'16

Учредители:

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»,
Минздрава России;
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:

115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Статьи направлять по адресу:
adv.mol.onc@ronc.ru

*Выпускающий редактор Н.В. Жукова
Корректор В.А. Наумкина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук*

*Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru*

*Руководитель проекта
Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru*

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору*

*в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014 г.)*

**При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.**

**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.
В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.
2016. Том 3. № 3. 1–86

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Тверской печатный двор»
Тираж 1000 экз.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории методов скрининга канцерогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

Глушанкова Наталья Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, руководитель отдела опухолевого роста ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Казанский Дмитрий Борисович, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карпухин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

Кжышковска Юлия Георгиевна, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейм университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующая отделением научного планирования и подготовки кадров ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией механизмов прогрессии эпителиальных опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., заведующий лабораторией биохимии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Миркин Сергей Моисеевич, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель отделения прогноза Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Минздрава России – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр», заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель начальника Управления по взаимодействию с РАН, ответственный секретарь Научно-координационного совета Федерального агентства научных организаций России (Москва, Россия)

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (Томск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Васильев Юрий Маркович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, вице-президент Общества клеточной биологии РАН (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, главный онколог Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Зарилде Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

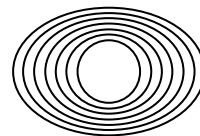
Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Since 2014, the journal "Advances in Molecular Oncology" was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



**N. N. Blokhin Russian
Cancer Research Center,
Ministry of Health of Russia**

Online version of the journal
is available at:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zborovskaya Irina B., PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Yakubovskaya Marianna G., PhD, DSc, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Gudkova Margarita V., PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2014

3 Vol. 3
'16

Founders:

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, 24 Build. 15 Kashirskoe Shosse, Moscow Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19, e-mail: abv@abvpress.ru www.abvpress.ru

Articles should be sent to e-mail: adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova

Proofreader V.A. Naumkina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk
Subscription & Distribution Service I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19, base@abvpress.ru

Project Manager R.A. Kuznetsov, +7 (499) 929-96-19, kuznetsov@abvpress.ru

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information

Technologies, and Mass Media

(ИИ No. ФС77-57560 dated 08 April 2014).

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the journal "Uspekhi molekulyarnoy onkologii".

The editorial board is not responsible for advertising content.

The authors, point of view given in the articles may not coincide with the opinion of the editorial board.

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy onkologii. 2016. Vol. 3. No. 3. 1–86

© PH "ABV-Press", 2016

Pressa Rossii catalogue index: 93562

Printed at the Tverskoy Pechatny Dvor

1,000 copies

EDITORIAL BOARD

Belitsky Gennady A., *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Berstein Lev M., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

Bozhenko Vladimir K., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Gloushankova Natalia A., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Gurtsevitch Vladimir E., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Imyanitov Eugeny N., *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Tumor Growth of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

Kazansky Dmitry B., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Karpukhin Aleksander V., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)*

Kzhyskovska Juliya G., *PhD, DSc, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)*

Kubasova Irina Yu., *PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kushlinskii Nikolay E., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry of the Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Lazarevich Natalia L., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Epithelial Tumors Progress Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Lichtenstein Anatoly V., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of Tumors Biochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Mazurenko Natalia N., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Mirkin Sergey M., *Professor, White Family Department of Biology, Chair in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)*

Sergeeva Natalia S., *PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics Department of the P.A. Herzen Moscow Scientific and Research Cancer Institute of the Ministry of Health of Russia – a branch of National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Stepanova Evgenia V., *MD, DSc, Deputy Head of the Department for Interaction with the RAS, Secretary in Charge of the Scientific Coordination Council of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia, (Moscow, Russia)*

Tjulandin Sergey A., *MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Research Work of the Research Institute of Clinical Oncology of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tchevkina Elena M., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tcherdyntseva Nadezhda V., *PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk, Russia)*

EDITORIAL COUNCIL

Vasiliev Yury M., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Chief Researcher of Research Institute of Carcinogenesis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Vice President of the Cell Biology Society of the RAS (Moscow, Russia)*

Gudkov Andrey V., *PhD, DSc, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Chair of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)*

Davydov Mikhail I., *MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Chief Oncologist of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Zaridze David G., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Kopnin Boris P., *MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*



Издательский дом
«АВВ-пресс»

НЕ ПРОСТО ИЗДАТЕЛЬСТВО – СООБЩЕСТВО МЕДИЦИНСКИХ СПЕЦИАЛИСТОВ

www.abvpress.ru

Ж У Р Н А Л Ы

www.oncology.abvpress.ru
ОНКОУРОЛОГИЯ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

www.oggh.abvpress.ru
**Опухоли ГОЛОВЫ
и ШЕИ**
ежеквартальный
научно-практический
рецензируемый
журнал

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
ОПУХОЛИ
ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ
маммология | гинекология
www.ojra.abvpress.ru

ОНКО
ГЕМАТОЛОГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
www.onchematology.abvpress.ru

УСПЕХИ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ОНКОЛОГИИ | Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://jmo.abvpress.ru/jour>
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Онкологическая
КОЛОПРОКТОЛОГИЯ ИЗДАНИЕ
для специалистов в области
диагностики и лечения
колоректального рака
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
<http://ok.abvpress.ru>

РУССКИЙ
ЖУРНАЛ
**ДЕТСКОЙ
НЕВРОЛОГИИ**
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
www.rjcn.ru

**АНДРОЛОГИЯ
И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
КЛИНИЦИСТ

**Нервно-мышечные
БОЛЕЗНИ** | ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ
www.nmb.elpub.ru

**Российский
Биотерапевтический
Журнал** Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal
ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ


Журнал имени
проф. Б.М. Костюченко
**РАНЫ
и
РАНЕВЫЕ
ИНФЕКЦИИ**


Г А З Е Т Ы

Онкология Сегодня
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ОНКОЛОГОВ

Урология сегодня
специализированное издание для урологов
www.urology.ru
Выпуск 1 2014 год

СОВРЕМЕННАЯ
КАРДИОЛОГИЯ 

СОВРЕМЕННАЯ КАРДИОЛОГИЯ

Наши издания доступны в печатной форме, на сайтах издательства,
а также в мобильных приложениях  iOS

PUBLISHING HOUSE

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

О.Е. Андреева, М.А. Красильников

Феномен РНК-интерференции в онкологии: достижения, проблемы и перспективы. 8

И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, А.В. Комельков

Белки мембранных микродоменов и их участие в онкогенезе 16

Л.Г. Соленова

Вторые первичные опухоли у онкологических больных: эпидемиология, роль противоопухолевой терапии 30

Г.А. Белицкий, Е.А. Лесовая, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская

Вторые первичные опухоли у онкологических больных: лекарственный канцерогенез в онкологии 44

В.В. Делекторская

Морфологическая классификация нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы: современное состояние проблемы и нерешенные вопросы 56

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Т.И. Фетисов, Л.Р. Тилова, Е.А. Лесовая, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова,
Л.С. Труханова, О.В. Морозова, Е.В. Шипаева, Р.В. Иванов, А.А. Пурмаль,
Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, А.В. Гудков, К.В. Гурова, К.И. Кирсанов*

Противоопухолевое действие кураксина CBLO137 на моделях аденокарциномы толстой кишки 67

В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, Л.В. Кривошеева, И.С. Голубева, Л.А. Савлущинская, Д.А. Хоченков

Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. 73

А.А. Лушникова, Л.Ф. Морозова, И.С. Абрамов, Т.С. Дубровина, А.В. Балбуцкий

Генетические изменения в линии Pnч1-КК светлоклеточного рака почки человека 81

REVIEWS

O.E. Andreeva, M.A. Krasil'nikov

The phenomenon of RNA interference in oncology: advances, problems and perspectives. 8

I.B. Zborovskaya, S.A. Galetskiy, A.V. Komelkov

Microdomain forming proteins in oncogenesis 16

L.G. Solenova

Second primary malignancies in cancer survivors: epidemiology, role of anticancer therapy 30

G.A. Belitskiy, E.A. Lesovaya, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya

Second primary malignancies of cancer patients: treatment-related carcinogenesis. 44

V.V. Delektorskaya

Morphological classification of digestive neuroendocrine neoplasms: the current concepts and controversies. 56

EXPERIMENTAL REPORTS

*T.I. Fetisov, L.R. Tilova, E.A. Lesovaya, E.E. Antoshina, T.G. Gor'kova,
L.S. Trukhanova, O.V. Morozova, E.V. Shipaeva, R.V. Ivanov, A.A. Purmal',
G.A. Belitskiy, M.G. Yakubovskaya, A.V. Gudkov, K.V. Gurova, K.I. Kirsanov*

Antitumor effect of the curaxin CBL0137 on the models of colon cancer 67

V.P. Deryagina, N.I. Ryzhova, L.V. Krivosheeva, I.S. Golubeva, L.A. Savluchinskaya, D.A. Khochenkov

**iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course
of tumor growth of different histogenesis. 73**

A.A. Lushnikova, L.F. Morozova, I.S. Abramov, T.S. Dubrovina, A.V. Balbutskiy

Genetic alterations in the human kidney clear cell carcinoma line Pn041-КК. 81

Феномен РНК-интерференции в онкологии: достижения, проблемы и перспективы

О.Е. Андреева, М.А. Красильников

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Михаил Александрович Красильников krasilnikovm1@yandex.ru

Обзор посвящен РНК-интерференции — сравнительно недавно открытому биологическому механизму негативной регуляции экспрессии генов. В основе этого механизма лежит блок трансляции и/или деградация информационной матричной РНК под действием малых некодирующих РНК, наиболее известными представителями которых являются микроРНК и короткие интерферирующие РНК. В обзоре рассмотрены молекулярные процессы образования малых РНК, механизм действия и возможность их использования в качестве противоопухолевых терапевтических препаратов. Особое внимание отведено проблеме доставки малых РНК *in vivo*, в том числе с помощью липосом и экзосом, и перспективам использования таких препаратов в клинической практике.

Ключевые слова: РНК-интерференция, злокачественная опухоль, микроРНК, короткие интерферирующие РНК, РНК-доставка, липосома, экзосома

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-08–15

The phenomenon of RNA interference in oncology: advances, problems and perspectives

O.E. Andreeva, M.A. Krasil'nikov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Review describes the phenomenon of RNA interference — the recently discovered biological mechanism of the negative regulation of gene expression. The mechanism is based on the block of the translation and/or degradation of messenger RNA under short non-coding RNA, among them: microRNA and small interfering RNA. The paper reviews the molecular processes of the formation of small RNA, the mechanism of their action and the feasibility of small RNA implementation in the anti-tumor therapy. Specially, we analyze the approaches to *in vivo* delivery of small RNA, in particular — the liposome and exosome constructs, and perspectives of the involvement of such constructs in the cancer treatment.

Key words: RNA interference, malignant tumor, microRNA, small interfering RNA, RNA delivery, liposome, exosome

РНК-интерференция: общие представления

РНК-интерференция — естественный биологический процесс подавления экспрессии определенных генов, в основе которого лежит блок трансляции и/или деградация информационной матричной РНК (мРНК) под действием так называемых малых некодирующих РНК. Явление РНК-интерференции было впервые описано А. Fire и С.С. Mello, получившими впоследствии за это открытие Нобелевскую премию [1]. Авторы на примере *Caenorhabditis elegans* продемонстрировали способность коротких двуцепочечных РНК вызывать подавление экспрессии гомологичных генов. В дальнейших исследованиях установлен и хорошо изучен механизм этого явления, основанного на процессинге малых РНК с образованием коротких 21–23-нуклеотидных двуцепочечных РНК и последующим их связыванием с гомологичными участками мРНК [2, 3].

В семействе малых некодирующих РНК выделяют несколько групп, к основным из которых относят микроРНК (miРНК) и короткие интерферирующие РНК

(siРНК). Оба вида обладают сходной структурой и являются ингибиторами экспрессии генов, основные различия между ними заключаются в механизме образования и степени гомологии к таргетным мРНК [4]. Предшественниками miРНК считаются первичные (primary) miРНК (pri-miРНК) эндогенного происхождения, транскрибируемые с соответствующих генов, кодирующих miРНК [5]. Pri-miРНК под действием внутриядерного ферментативного комплекса Drosha расщепляются до 70–100-нуклеотидных фрагментов (pre-miРНК), которые транспортируются в цитоплазму и подвергаются дальнейшему процессингу в ферментативной системе Dicer до образования miРНК [6]. Зрелые miРНК представляют собой 21–23-нуклеотидные последовательности, которые не полностью комплементарны таргетным мРНК и благодаря этому способны инактивировать одновременно несколько различных мРНК [7]. В отличие от miРНК к предшественникам siРНК относятся короткие двуцепочечные РНК (dsРНК) как эндогенного, так и эк-

зогенного (вирусного) происхождения, причем siРНК обладают полной комплементарностью к таргетным мРНК и, соответственно, являются высокоспецифическими ингибиторами синтеза белка.

Процессинг pre-miРНК и dsРНК с образованием соответственно miРНК и siРНК регулируется одной и той же ферментативной системой, включающей рибонуклеазный комплекс Dicer [8, 9]. Затем зрелые miРНК и siРНК связываются РНК-индуцируемым блокирующим комплексом RISC (RNA-Induced Silencing Complex), в котором переходят в одноцепочечное состояние с последующей деградацией одной из цепей, тогда как вторая цепь в комплексе с эндонуклеазой Argonaute 2, входящей в состав RISC, взаимодействует с комплементарными участками информационной мРНК, приводя к деградации последней и/или блоку трансляции (см. рисунок) [10].

Малые РНК и направленная регуляция экспрессии генов

В 2001 г. впервые были описаны эффекты трансфекции малых РНК в эукариотические клетки [4]. Дальнейшие исследования по таргетной доставке наночастиц, несущих siРНК в человеческие клетки путем

систематических инъекций, послужили мощным толчком для развития новых подходов с применением РНК-интерференции в клинической практике [11].

Пристальное внимание к РНК-интерференции, как к перспективному инструменту направленного воздействия на экспрессию генов, объясняется следующими факторами:

- специфичность действия;
- незначительные побочные эффекты;
- легкость синтеза препаратов РНК.

Правильно подобранные последовательности РНК могут избирательно ингибировать экспрессию генов, связанных с теми или иными нарушениями, такими как гиперэкспрессия онкогенов или мутации онкосупрессоров [12]. В настоящее время более 20 препаратов на основе малых РНК находятся на стадии клинических испытаний [12, 13].

Широкое использование РНК-препаратов в клинической практике ограничивается рядом факторов.

В физиологических условиях РНК нестабильна. Эффективное действие miРНК/siРНК предполагает их доставку к опухоли через кровеносное русло, однако при внутривенном введении молекулы деградируют

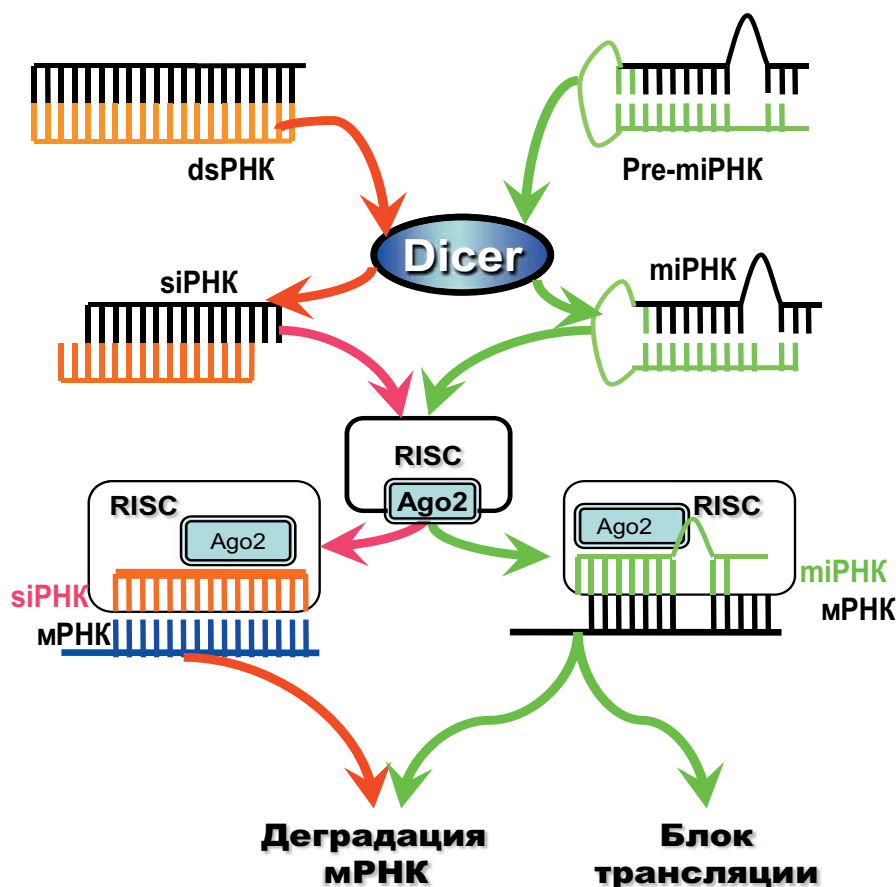


Схема образования в клетках siРНК и miРНК. Предшественники малых РНК, dsРНК и pre-miРНК, поступают в рибонуклеазный комплекс Dicer, в котором подвергаются процессингу с образованием коротких двуцепочечных РНК, siРНК и miРНК соответственно. Зрелые siРНК и miРНК связываются РНК-индуцируемым блокирующим комплексом RISC, в котором переходят в одноцепочечное состояние с последующей деградацией одной из цепей. Другая цепь в комплексе с эндонуклеазой Argonaute 2 взаимодействует с комплементарными участками информационной мРНК, приводя к деградации последней и/или блоку трансляции

под действием сывороточных нуклеаз, экскретируются почками, поглощаются фагоцитами и агрегируют с белками сыворотки [14]. Нуклеазная активность в сыворотке крови и тканях является, по сути, первым барьером при доставке малых РНК. Основная нуклеаза плазмы — 3'-экзонуклеаза, однако разрывы межнуклеотидных связей могут происходить не только на 3'-конце, но и в середине молекулы РНК. Период полураспада miРНК/siРНК в кровеносном русле составляет от нескольких минут до 1 ч [15].

Также необходимо отметить роль почек в выведении РНК из организма: *in vivo* продемонстрировано преимущественное поглощение РНК именно почками [16]. Дополнительный барьер для доставки miРНК/siРНК *in vivo* — поглощение ретикулоэндотелиальной системой, в первую очередь фагоцитирующими клетками, в том числе циркулирующими моноцитами и тканевыми макрофагами [17], основными физиологическими функциями которых являются очистка от инородных патогенов, удаление клеточного дебриса и утилизация апоптотических клеток [18]. Наибольшее количество тканевых макрофагов представлено в печени (купферовские клетки) и селезенке — органах с высоким уровнем васкуляризации, пропускающих через себя большой объем крови [19].

Попадая в клетки-мишени, РНК, находящиеся в свободном состоянии, быстро деградируют. Они накапливаются в ранних эндосомах, последовательно сливающихся с сортировочными эндосомами, содержимое которых, в свою очередь, направляется в поздние эндосомы [20]. При этом уровень рН эндосомального компартмента значительно снижен (рН 5,0–6,2) по сравнению с нейтральным рН (рН 7,4) цитозольного компартмента и межклеточного пространства [21]. Затем эндосомы направляются в лизосомы, в которых их содержимое еще сильнее окисляется (рН 4,5) и деградирует после связывания нуклеазами [22].

Свободная двуцепочечная РНК обладает гидрофильными и анионными свойствами и в свободном виде не может проникнуть в клетку. Для пересечения мембраны необходима упаковка РНК, связывание ее с каким-либо носителем [23].

Несмотря на эти ограничения, терапевтический потенциал малых РНК велик, однако на пути успешного применения препаратов miРНК/siРНК в клинической практике стоит проблема их специфической доставки в опухолевые клетки.

Доставка малых РНК в опухолевые клетки:

химическая модификация и искусственные носители

Для системного введения РНК *in vivo* необходимо обеспечить [14]:

- стабильность в сыворотке крови;
- неиммуногенность;
- незначительность связывания белками плазмы и нетрансформированными клетками;
- возможность избежать фильтрации почками;

- проникновение к клеткам опухоли через стенки сосудов;
- попадание в клетку и освобождение из эндосом;
- отсутствие токсичности.

Модификации РНК. Модификации молекул miРНК/siРНК, позволяющие защитить их от действия нуклеаз, увеличивают их физиологическую стабильность [24]. К таким модификациям относятся группы 2-О-метил и 2-диоокси-2-флюоро, а также тиофосфатные линкеры [10, 25]. Несмотря на способность таких модификаций повышать стабильность miРНК/siРНК и увеличивать иммунологическую толерантность, этого оказывается недостаточно для обеспечения свободного прохождения РНК через отрицательно заряженную плазматическую мембрану [26].

Упаковка РНК в наноконтейнеры из катионных полимеров позволяет решить проблему заряда для транспортировки РНК через клеточную мембрану, однако основным ограничением их использования является иммуногенность полимеров [27]. Основной путь выведения наночастиц из крови происходит посредством адсорбции на них иммунореактивных белков (опсонизации) и последующего поглощения системой мононуклеарных фагоцитов [19]. Стратегия снижения связывания наночастиц белками плазмы заключается в использовании разветвленных полимеров полиэтиленгликоля, покрывающих поверхность наноконтейнера с РНК [21]. Полиэтиленгликоль значительно увеличивает продолжительность их циркуляции в крови, защищая от взаимодействия с клетками иммунной системы и белками плазмы.

In vivo малые РНК выводятся через печень, селезенку и легкие, однако основной путь их экскреции связан с почками [28]. Размер поры гломерул, через которые происходит фильтрация, составляет около 8 нм. Молекулы меньше 50 kDa, в том числе miРНК и siРНК массой 13 kDa, проходят в канал и экскретируются с мочой [19]. Синтетические материалы, связывающие РНК и образующие наночастицы большего диаметра, используют для защиты РНК от гломерулярной фильтрации в почках, повышая биодоступность для целевых органов [29]. Многие разработанные системы основаны на применении частиц размером более 20 нм [16].

Синтетические наноконтейнеры, липосомы, трехблочные полимеры. В последнее время активно разрабатываются системы, в которых носителями miРНК и siРНК являются везикулы, мицеллы, липосомы и неорганические гибридные частицы [30–32]. Основанием для разработки таких систем считается эффект повышенной проницаемости и накопления: наночастицы размером от десятков до сотен нанометров накапливаются преимущественно в опухолевых, а не в нормальных тканях благодаря аномальной структуре кровеносных сосудов, возникающих *de novo* при неоваскуляризации [33].

Липосомы — синтетические частицы с липидной мембраной, которые могут поглощать как гидрофобные, так и гидрофильные молекулы [34]. РНК в составе

липосом попадает в клетку путем эндоцитоза, поэтому для повышения избирательности липосом используют включение в их состав таргетных лигандов [35, 36]. Связываясь с рецепторами, экспонированными на мембранах таргетных клеток, такие частицы поглощаются по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза [25]. Однако адсорбция белков плазмы на поверхности этих частиц может препятствовать связыванию лиганда и рецептора [37]. В других системах используются пептиды, проникающие через мембрану (cell penetrating peptides) [38], благодаря которым наночастицы могут проникать в клетку не только по механизму эндоцитоза, но и независимым от него образом [39]. Некоторые системы используют чувствительные к pH материалы, меняющие конформацию при снижении уровня pH и обеспечивающие таким образом высвобождение РНК из эндосом [40].

В синтетических липосомах присутствуют, как правило, гидрофобные молекулы, которые образуют внутреннюю стенку мицеллы, и гидрофильные молекулы, формирующие оболочку [31]. Гидрофильные участки содержат катионы и связывают отрицательно заряженные молекулы ДНК и РНК [40].

Полимеры для производства липосом организованы по блочному принципу. Примером могут служить трехблочные полимеры типа АВС, которые содержат:

- гидрофильный блок (полиэтиленгликоль);
- гидрофобное ядро: поли(капролактон), поли(*n*-бутил акрилат) и др.;
- катионный блок: поли(2-аминоэтилэтиленфосфат) и полиэтиленимин (PEI) [41].

Наноконтейнеры имеют тенденцию накапливаться в печени, легких, селезенке и почках, что, помимо неизбежных токсических эффектов, существенно ограничивает их использование в других тканях [14].

Доставка малых РНК в опухолевые клетки: экзосомы

Общие представления об экзосомах. Клетки эукариот являются источниками мембранных везикул — окруженных мембраной фрагментов цитоплазмы, секретируемых во внеклеточное пространство. Везикулы могут формироваться в эндолизосомальном компартменте или на плазматической мембране клетки. Среди различных видов секретируемых мембранных везикул выделяются экзосомы — везикулы диаметром 40–100 нм, которые покидают клетку при слиянии внутриклеточных мультивезикулярных комплексов (эндосом) с плазматической мембраной клетки. Экзосомы играют особую роль в межклеточной коммуникации, позволяя осуществлять горизонтальную передачу от клетки к клетке не только мембранных компонентов, но и цитоплазматического содержимого, в том числе белков и нуклеиновых кислот. Экзосомы в большом количестве присутствуют в крови, моче и других биологических жидкостях и вовлечены в различные физиологические и патологические процессы, что позволяет использовать их в качестве биомаркеров для диагностики некоторых заболеваний.

Все экзосомы вне зависимости от вида родительских клеток содержат белки, связанные с мембранным транспортом и реорганизацией мембраны (Rab GTPases, аннексины, флотиллин), белки, участвующие в биогенезе мультивезикулярных телец (Alix и TSG101), белки теплового шока (hsp70 и 90), интегрины и тетраспанины (CD9, CD63, CD81 и CD82) [39]. Некоторые из этих белков специфичны для экзосом и могут использоваться в качестве экзосомальных маркеров (например, Alix, флотиллин, TSG101, CD63). Еще одна особенность экзосом — высокое содержание липидов, характерных для липидных рафтов (холестерин, сфинголипиды, керамиды и гликофосфолипиды).

Почти все типы клеток могут секретировать экзосомы, и большинство работ, опубликованных за последнее время, указывает на их исключительную роль как в поддержании нормальных физиологических реакций, так и в патогенезе.

Интересным свойством экзосом с точки зрения генной терапии является их способность осуществлять горизонтальный перенос генетического материала. В 2006 г. было показано, что везикулы эмбриональных стволовых клеток содержат мРНК плюрипотентных белков, участвующих в созревании предшественников гематопозитических клеток (HSPCs) [42]. Затем в микровезикулах, секретируемых опухолевыми клетками, были обнаружены опухолевые маркеры и мРНК, которые *in vitro* могут передаваться моноцитам [43]. В других работах описана способность микровезикул, секретируемых клетками-предшественниками эндотелиоцитов, активировать ангиогенные программы в эндотелиоцитах посредством селективного переноса мРНК [44]. Отмечено, что экзосомы, продуцируемые клетками глиобластомы, также осуществляют перенос мРНК, которые меняют синтез белка *de novo* в реципиентных клетках [45]. В работе Н. Valadi и соавт. впервые было показано, что в микровезикулах и экзосомах содержится не только мРНК, но и miРНК [46]. Получены свидетельства участия экзосом в переносе функциональных miРНК, причем донорами экзосом могут быть различные типы клеток, в том числе эмбриональные стволовые клетки [47]. Продемонстрирована способность экзосом доставлять miРНК к мезенхимальным стволовым клеткам и стволовым клеткам печени [48], а также к Т-лимфоцитам, причем последние участвуют в однонаправленном переносе miРНК к антигенпрезентирующим клеткам посредством секреции экзосом [49].

В целом имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о возможности использования микровезикул и экзосом — основных межклеточных переносчиков РНК естественного происхождения — в качестве эффективных средств доставки в клетки противоопухолевых агентов — как генно-инженерных конструкций, так и химиопрепаратов.

Структурные особенности экзосом опухолевых клеток. Структура и состав экзосом могут сильно варьировать в зависимости от вида клеток-продуцентов,

и в этом плане опухолевые клетки не являются исключением. Так, в работе [50] исследованы различия в адгезии и поглощении экзосом, продуцируемых опухолевыми клетками (линии PC3, MCF-7, MDA-MB-231, SK-Mel-5, H460) и иммортализованными нетрансформированными клетками (16HBE, WPMY-1, ARPE-19). Анализ связывания экзосом с клетками родительских линий и другими, в том числе иммортализованными, показал, что опухолевые клетки в целом гораздо активнее поглощают экзосомы. При этом нельзя достоверно утверждать, что они поглощают «свои» экзосомы, полученные от той же клеточной линии, с большей специфичностью, чем экзосомы от других источников, поскольку увеличивается и неспецифическое поглощение экзосом по причине активного эндоцитоза. Анализ физических свойств экзосом, полученных из культуральной среды линий PC3, MCF-7 и MDA-MB-231, не выявил различий, следовательно, различная эффективность их поглощения клетками может определяться биологическими свойствами липидных и/или белковых компонентов экзосом.

Мембрана экзосом обогащена холестерином, сфингомиелином и анионными фосфолипидами, в том числе фосфатидилсеринем, что придает экзосомам прочность и стабилизирует их структуру. Помимо липидного состава к важным компонентам для связывания с поверхностью клетки относятся белки экзосом, основными представителями которых являются белки адгезии, тетраспанины, белки ICAM (intercellular adhesion molecule).

Адгезивные белки, особенно интегрины, содержатся в экзосомах в большом количестве и служат рецепторами клеточной адгезии. Представители другой группы белков, тетраспанины, предположительно отвечают за выбор целевых клеток и взаимодействие с ними [51]. Белки ICAM также способствуют связыванию экзосом с поверхностью реципиентных клеток [52]. Необходимо отметить, что опухолевые клетки гораздо активнее поглощают экзосомы, чем синтетические липосомы или липосомы, сформированные из экзосомных липидов [27], что указывает на важность белков экзосом для реализации их биологической активности.

Экзосомы как средства доставки малых РНК. Ключевая проблема в использовании экзосом для доставки РНК — загрузка РНК-препаратов в экзосомы. Для этого применяются несколько подходов, в том числе электропорация, химическая трансфекция и химическая модификация экзосом.

Электропорация. При использовании электропорации эффективность упаковки РНК в экзосомы не зависит от последовательности РНК, и, собственно, эффективность трансфекции определяется правильным выбором параметров, условий и оборудования. Основной проблемой данного подхода является неправильная оценка эффективности фактической загрузки РНК в экзосомы, вызванная денатурацией РНК. Так, в ра-

боте [53] показано, что электропорация приводит к агрегации siРНК, поэтому эффективность загрузки siРНК, определяемая измерением флуоресценции, неадекватна и заметно завышена (фактическое содержание siРНК в экзосомах не превышало 0,05 %).

Химическая трансфекция. Для загрузки РНК в экзосомы используют также липидные трансфекционные реагенты, такие как Hiperfekt и Lipofectamin 2000. Существенное ограничение этого метода — невозможность полного отделения от экзосом несвязавшегося трансфекционного комплекса РНК, что значительно затрудняет интерпретацию получаемых данных, во всяком случае при экспериментальных исследованиях [54].

Химическая модификация экзосом. Основной подход подразумевает предварительную трансфекцию донорских клеток векторными конструкциями в целях обогащения экзосом соответствующим белком [55]. Впервые возможность использования модифицированных экзосом для таргетной доставки siРНК продемонстрирована в экспериментах на дендритных клетках [56, 57]. Незрелые дендритные клетки были трансфицированы плазмидой для экспрессии химерного белка экзосом Lamp2b, слитого с RVG (rabies viral glycoprotein) — пептидом, специфично экспрессирующимся в мозге. Экзосомы, несущие RVG, были получены из культур таких клеток и загружены siРНК GAPDH с помощью электропорации. Доставка целевых RVG-экзосом *in vivo* путем инъекции в хвостовую вену привела к значительному подавлению GAPDH в нескольких областях мозга у мышей [58].

В других исследованиях экзосомы применяли для системной доставки экзогенных miРНК [59]. Так, трансфекция моноцитов miРНК-150 приводила к усилению продукции экзосом, обогащенных miРНК-150, которые использовали для доставки последней в реципиентные клетки [59]. Аналогичный подход был применен для обогащения экзосом miРНК-143 [60]. Успешные эксперименты были проведены по доставке с помощью модифицированных экзосом siРНК и dsРНК [61].

Экзосомы и малые РНК: перспективы клинического применения

На сегодняшний день исследования экзосом в качестве средств доставки РНК находятся преимущественно на стадии экспериментальных разработок, но работы в этом направлении ведутся чрезвычайно активно. В первую очередь, это поиск оптимального варианта экзосом, содержимое которых было бы достаточно нейтральным и не провоцировало рост опухоли [62, 63]. С этой точки зрения среди потенциальных кандидатов на роль доноров экзосом следует отметить иммортализованные мезенхимальные стволовые клетки, которые потенциально могут быть использованы в качестве средств доставки РНК [64].

Для повышения специфичности экзосом разрабатываются конструкции, содержащие fusion-белки, в которых сигнальные пептиды или антитела к опухо-

левым антигенам фиксированы с поверхностными белками экзосом [51]. Отдельный интерес представляет использование экзосом в качестве носителей не только siРНК, но и других типов малых РНК, в том числе miРНК [65], ингибиторов miРНК [66], плазмид для экспрессии shРНК [55]. Среди успешно разработанных экспериментальных систем доставки малых РНК с помощью экзосом можно отметить эффективную доставку siРНК MAPK1 в моноциты и лимфоциты [67], siРНК RAD-51 (белок из семейства ферментов репарации) [68], с-Мус [69], TGF- β 1 [70], PLK-1 (polo-like kinase 1) [71], а также доставку некоторых miРНК и/или их ингибиторов [72, 73]. Работы в этом направлении ведутся, и можно рассчитывать, что в ближайшее время они перейдут в фазу клинических исследований.

Заключение

Малые РНК miРНК и siРНК, являясь по природе высокоспецифичными ингибиторами синтеза белков, нашли широкое применение в экспериментальных исследованиях, в первую очередь как инструмент, позволяющий избирательно блокировать синтез определенных молекул и тем самым оценить их вклад в те или иные внутриклеточные процессы. На этом же основании и применение малых РНК в клинической практике как таргетных препаратов, направленных на подавление экспрессии определенных белков, ассоциированных с развитием данного заболевания.

Несмотря на большой потенциал использования miРНК и siРНК в терапевтических целях, лишь несколько препаратов проходят клинические испытания. Основные причины этого — низкая стабильность малых РНК в организме и отсутствие специфических средств доставки РНК к клеткам-мишеням. Средства доставки, которые используются сегодня, в том числе описанные выше наночастицы и липосомы, отличаются высокой токсичностью, слабой избирательностью и низкой эффективностью при проникновении в клетки. Именно из-за этого активно разрабатываются препараты siРНК наружного применения, главным образом для лечения заболеваний глаз и кожных болезней, при которых вопросы специфической доставки частично снимаются [74]. Что касается терапии онкологических заболеваний (гепатоцеллюлярной карциномы, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, меланомы и некоторых других), то в настоящее время проходят клинические испытания несколько препаратов на основе siРНК [75]. Одно из новых направлений —

комбинация siРНК с miРНК. Если siРНК высокоизбирательны в отношении подавления синтеза определенного белка, то miРНК обычно регулируют экспрессию целого набора генов, включая нужный белок. Поэтому комбинация этих 2 видов РНК, как ожидается, может существенно усилить эффективность действия препарата.

Безусловно, основной прогресс в разработке препаратов miРНК и siРНК можно ожидать только при существенном совершенствовании средств доставки. С этой точки зрения наибольший интерес исследователей привлекают экзосомы как естественные средства доставки, постоянно циркулирующие в крови и свободно проникающие в клетки-мишени. К основным преимуществам экзосом относятся длительное сохранение в неповрежденном виде содержимого экзосом, способность легко инкорпорировать внутрь клеток-реципиентов, низкие иммуногенность и токсичность. Главный недостаток экзосом — отсутствие избирательности доставки, и сегодня усилия исследователей направлены именно на разработку модифицированных экзосом, несущих на своей мембране белки, узнающие клетки-мишени [75].

В заключение следует отметить, что, несмотря на специфичность действия малых РНК и их способность избирательно блокировать активность отдельных генов белков, нельзя ожидать, что такие препараты будут абсолютно эффективны в лечении онкологических заболеваний, даже если они будут успешно блокировать экспрессию ключевых онкобелков. Причина этого — быстро развивающаяся резистентность опухолей к препаратам, обусловленная реаранжировкой внутриклеточных сигнальных путей и стимуляцией тех из них, которые идут в обход заблокированных белков. Один из подходов к увеличению эффективности таргетных соединений — использование комбинации препаратов с разнонаправленным действием, блокирующих одновременно несколько сигнальных путей в клетке. Дальнейшие исследования малых РНК и разработка современных средств доставки должны привести к созданию новых противоопухолевых препаратов, которые будут отличаться большей эффективностью и продолжительностью действия.

Работа поддержана Российским научным фондом, проект № 14-15-00362 (раздел исследований экзосом) и Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 16-04-00347.

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

1. Fire A., Xu S., Montgomery M.K. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806–11.
2. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404(6775):293–6.
3. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101(1):25–33.
4. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494–8.
5. Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136(4):642–55.
6. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
7. Ohshima K., Inoue K., Fujiwara A. et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010;5(10):e13247.
8. Nykanen A., Haley B., Zamore P.D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107(3):309–21.
9. Whitehead K.A., Langer R., Anderson D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(2):129–38.
10. Dominska M., Dykxhoorn D.M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 8):1183–9.
11. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 2010;464(7291):1067–70.
12. Burnett J.C., Rossi J.J., Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol J* 2011;6(9):1130–46.
13. Oh Y.K., Park T.G. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(10):850–62.
14. Alexis F., Pridgen E., Molnar L.K., Farokhzad O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 2008;5(4):505–15.
15. Layzer J.M., McCaffrey A.P., Tanner A.K. et al. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 2004;10(5):766–71.
16. Castanotto D., Rossi J.J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009;457(7228):426–33.
17. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8(12):958–69.
18. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231–41.
19. van de Water F.M., Boerman O.C., Wouterse A.C. et al. Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug Metab Dispos* 2006;34(8):1393–7.
20. Stoorvogel W., Strous G.J., Geuze H.J. et al. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* 1991;65(3):417–27.
21. Martina M.S., Nicolas V., Wilhelm C. et al. The *in vitro* kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages. *Biomaterials* 2007;28(28):4143–53.
22. Ohkuma S., Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(7):3327–31.
23. Nguyen K.T., Zhao Y. Engineered Hybrid Nanoparticles for On-Demand Diagnostics and Therapeutics. *Acc Chem Res* 2015;48(12):3016–25.
24. Deleavey G.F., Damha M.J. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem Biol* 2012;19(8):937–54.
25. Yu B., Zhao X., Lee L.J., Lee R.J. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS J* 2009;11(1):195–203.
26. Xu C.-F., Wang J. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian J Pharm Sci* 2015;10(1):1–12.
27. Smyth T.J., Redzic J.S., Graner M.W., Anchordoquy T.J. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(11):2954–65.
28. Rappaport J., Hanss B., Kopp J.B. et al. Transport of phosphorothioate oligonucleotides in kidney: implications for molecular therapy. *Kidney Int* 1995;47(5):1462–9.
29. Pan Q., Ramakrishnaiah V., Henry S. et al. Hepatic cell-to-cell transmission of small silencing RNA can extend the therapeutic reach of RNA interference (RNAi). *Gut* 2012;61(9):1330–9.
30. Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. Jr. ExtraPEG: a polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci Rep* 2016;6:23978.
31. Love K.T., Mahon K.P., Levins C.G. et al. Lipid-like materials for low-dose, *in vivo* gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(5):1864–9.
32. Lee H., Lytton-Jean A.K., Chen Y. et al. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery. *Nat Nanotechnol* 2012;7(6):389–93.
33. Akinc A., Querbes W., De S. et al. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol Ther* 2010;18(7):1357–64.
34. Haque M.E., McIntosh T.J., Lentz B.R. Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles “Nature’s own” fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* 2001;40(14):4340–8.
35. Ohkuma S., Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(7):3327–31.
36. Nguyen K.T., Zhao Y. Engineered hybrid nanoparticles for on-demand diagnostics and therapeutics. *Acc Chem Res* 2015;48(12):3016–25.
37. Salvati A., Pitek A.S., Monopoli M.P. et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol* 2013;8(2):137–43.
38. Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816(2):232–46.
39. Campbell I.D., Humphries M.J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3(3).
40. Semple S.C., Akinc A., Chen J. et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol* 2010;28(2):172–6.
41. Batrakova E.V., Kabanov A.V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release* 2008;130(2):98–106.
42. Ratajczak J., Miekus K., Kucia M. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20(5):847–56.
43. Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Weglarczyk K. et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(7):808–18.
44. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110(7):2440–8.
45. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* 2008;10(12):1470–6.

46. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 2007;9(6):654–9.
47. Yuan A., Farber E.L., Rapoport A.L. et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* 2009;4(3):e4722.
48. Collino F., Deregibus M.C., Bruno S. et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 2010;5(7):e11803.
49. Mittelbrunn M., Gutierrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011;2:282.
50. Smyth T.J., Redzic J.S., Graner M.W., Anchordoquy T.J. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(11):2954–65.
51. Hemler M.E. Targeting of tetraspanin proteins – potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(9):747–58.
52. Segura E., Nicco C., Lombard B. et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 2005;106(1):216–23.
53. Kooijmans S.A., Stremersch S., Braeckmans K. et al. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *J Control Release* 2013;172(1):229–38.
54. Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88.
55. Andaloussi S.E., Lehto T., Mager I. et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 2011;39(9):3972–87.
56. Munich S., Sobo-Vujanovic A., Buchser W.J. et al. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 2012;1(7):1074–83.
57. Mittelbrunn M., Gutierrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C. et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011;2:282.
58. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011;29(4):341–5.
59. Zhang Y., Liu D., Chen X. et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010;39(1):133–44.
60. Akao Y., Iio A., Itoh T. et al. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther* 2011;19(2):395–99.
61. Ohno S., Takanashi M., Sudo K. et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* 2013;21(1):185–91.
62. Thery C., Boussac M., Veron P. et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001;166(12):7309–18.
63. Wubbolts R., Leckie R.S., Veenhuizen P.T. et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003;278(13):10963–72.
64. Olson S.D., Kambal A., Pollock K. et al. Examination of mesenchymal stem cell-mediated RNAi transfer to Huntington's disease affected neuronal cells for reduction of huntingtin. *Mol Cell Neurosci* 2012;49(3):271–81.
65. Pegtel D.M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D.A. et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(14):6328–33.
66. Wang J.J., Wang Z.Y., Chen R. et al. Macrophage-secreted exosomes delivering miRNA-21 inhibitor can regulate BGC-823 cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(10):4203–9.
67. Wahlgren J., De L. Karlson T., Brisslert M. et al. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 2012;40(17):e130.
68. Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88.
69. Lunavat T.R., Jang S.C., Nilsson L. et al. RNAi delivery by exosome-mimetic nanovesicles – Implications for targeting c-Myc in cancer. *Biomaterials* 2016;102:231–8.
70. Zhang Y., Li L., Yu J. et al. Microvesicle-mediated delivery of transforming growth factor beta1 siRNA for the suppression of tumor growth in mice. *Biomaterials* 2014;35(14):4390–400.
71. Greco K.A., Franzen C.A., Foreman K.E. et al. PLK-1 Silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes. *Urology* 2016;91:241.
72. Momen-Heravi F., Bala S., Kodys K. et al. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci Rep* 2015;5:9991.
73. Wang J.J., Wang Z.Y., Chen R. et al. Macrophage-secreted exosomes delivering miRNA-21 inhibitor can regulate BGC-823 cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(10):4203–9.
74. Zhuang X., Xiang X., Grizzle W. et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011;19(10):1769–79.
75. Ha D., Yang N., Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* 2016;6(4):287–96.

Белки мембранных микродоменов и их участие в онкогенезе

И.Б. Зборовская, С.А. Галецкий, А.В. Комельков

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Борисовна Зборовская zborovskaya@mail.ru

Липидные рафты плазматических мембран формируются холестерином, сфингомиелидами и гликофинголипидами, а также различными белками. Эти микродомены участвуют в различных клеточных процессах, таких как перестройка мембраны, интернализация белков, передача сигналов, через них осуществляется проникновение вирусов внутрь клетки. Часть липидных рафтов стабилизирована специальными микродоменобразующими белками (МОБ). На сегодняшний день известно несколько семейств таких белков: кавеолыны, SPFH-семейство, тетраспанины, галектины, которые не только поддерживают целостность микродоменов, но и формируют «сигналосомы» и, таким образом, являются регуляторами многих сигнальных путей. Участие различных классов МОБ необходимо для нормального функционирования комплексов ростовых факторов с их рецепторами, регуляции интегринов, факторов реорганизации клеточного скелета и внеклеточного матрикса, везикулярного транспорта и т. д. МОБ вовлечены практически во все аспекты жизнедеятельности клетки, однако до сих пор классы МОБ принято рассматривать отдельно друг от друга. В представленном обзоре проведен анализ участия МОБ разных семейств в общих сигнальных путях, ассоциированных с канцерогенезом.

Ключевые слова: мембранные микродомены, микродоменобразующие белки, кавеолыны, флотиллины, стоматины, тетраспанины, галектины, сигнальная трансдукция, экзосомы, опухолевая прогрессия

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-16-29

Microdomain forming proteins in oncogenesis

I. B. Zborovskaya, S. A. Galetskiy, A. V. Komel'kov

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russia

Lipid rafts are lateral assemblies of cholesterol, sphingomyelin, glycosphingolipids and specific proteins within cell plasma membrane. These microdomains are involved into a number of important cellular processes including membrane rearrangement, protein internalization, signal transduction, entry of viruses into the cell. Some of lipid rafts are stabilized by special microdomain-forming proteins such as caveolins, SPFH domain containing superfamily, tetraspanins, galectins, which maintain integrity of rafts and regulate signal transduction via forming of "signalosomes". Involvement of the different lipid rafts is necessary in many situations such as binding of growth factors with their receptors, integrin regulation, cytoskeleton and extracellular matrix rearrangements, vesicular transport, etc.

However, such classes of microdomain-forming proteins are still considered separately from each other. In this review we tried to perform complex analysis of microdomain-forming proteins in regulation of cancer associated processes.

Key words: membrane microdomains, microdomain-forming proteins, caveolin, flotillin, stomatin, tetraspanin, galectin, signal transduction, exosomes, tumor progression

Общие сведения о мембранных микродоменах

Плазматическая мембрана (ПМ) — чрезвычайно организованная бислоенная клеточная структура, содержащая сложные липиды и белки. ПМ участвует во многих клеточных процессах, обеспечивая барьерную, транспортную, матричную, маркерную и рецепторную функции.

Жидкостно-мозаичная модель строения ПМ, предложенная в 1972 г. S.J. Singer и G.L. Nicolson [1], претерпела значительные изменения. Уже в 1973 г. A. Stier и E. Sackmann, используя физические методы при изучении микросомальной фракции клеток печени, показали существование особых участков в ПМ — мембранных микродоменов (Membrane Lipid Rafts, MLR) [2]. Еще 15 лет назад велись активные споры, касающиеся самой возможности существования этих лабильных

динамичных структур ПМ, не говоря уже о спектре белков и липидов, входящих в их состав [3]. Ныне наличие мембранных микродоменов, имеющих сложный уровень организации, и их участие во многих жизненно важных клеточных процессах уже не подвергается сомнениям.

В 2006 г. на авторитетном симпозиуме по липидным рафтам и клеточным функциям (Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function) мембранные микродомены были определены как упорядоченные, наноразмерные (10–200 нм), гетерогенные, высоко динамичные домены, которые компартиментализуют клеточные процессы. Стабильное состояние покоя в этих структурах может активироваться объединением специфических липид-липидных, белково-липидных и белок-белковых

взаимодействий. Липидные рафты соединены с цитоскелетом и обогащены минорными типами липидов (гликосфинголипиды, ганглиозиды, стеролы и липиды с насыщенными жирными кислотами), что обеспечивает их плотную структуру и возможность экспериментального выделения из мембран неионными детергентами при низкой температуре. Повышенная концентрация сфинголипидов, в частности ганглиозиды GM1, и холестерина является характерным признаком рафтов. Мембранные микродомены участвуют в целом спектре клеточных процессов, таких как перестройка мембраны, интернализация белков, везикулярный и ионный транспорт, через эти структуры осуществляется проникновение вирусов внутрь клетки и взаимодействие с внеклеточным матриксом. Микродомены в первую очередь участвуют в импорте и экспорте различных молекул, т. е. обеспечивают процессы передачи клеточных сигналов (сигнальную трансдукцию) внутри и вне клетки [4–6].

Плазматические микродомены имеют в своем составе специальные рафтообразующие белки нескольких семейств (кавеолины, SPFH-семейство, тетраспанины, галектины и клатрины), которые не только формируют и стабилизируют мембранные микродомены, удлиняя период их существования, но и аффинны к различным белкам – участникам определенных сигнальных путей (рис. 1). Некоторые рафтообразующие белки способны формировать микродомены не только в ПМ, но и в эндоплазматическом ретикулуме (эрлины) и митохондриях (прохибитины). Данные мембранные структуры могут инвагинировать в сторону цитоплазмы (кавеолы) или не инвагинировать (плоские рафты), что во многом зависит от их белкового состава.

Существует некоторое разночтение в обозначении данного типа белков. В англоязычной литературе их часто обозначают как LRP (Lipid Rafts Proteins), но с учетом факта концентрации в липидных рафтах огромного количества сигнальных белков, рецепторов, ферментов и т. п. наиболее адекватным, с нашей точки зрения, является термин «микродоменобразующие белки» (МОБ).

Все белки, связанные с биологическими мембранами, в зависимости от локализации делятся на категории: интегральные, полуинтегральные (погруженные одним концом во внешний или внутренний липидный слой) и поверхностные (расположенные на внутренней или внешней стороне мембраны). МОБ могут пронизывать ПМ насквозь (тетраспанины), частично встраиваться в нее с внутренней стороны мембраны (кавеолины, SPFH-семейство, иногда клатрины), располагаться с внешней (галектины) или с внутренней (клатрины) стороны ПМ (рис. 2).

Функции МОБ чрезвычайно разнообразны, однако большинство из них опосредуется через способность формировать «сигнасомы», т. е. концентрировать внутри мембранного микродомена рецепторы и сигнальные молекулы разных каскадов, осуществляя их регуляцию и облегчая перекрестные взаимодействия, поскольку МОБ могут создавать комплексы с резидентными белками и формировать сети [7–9].

Кроме того, МОБ во многом определяют адгезивные свойства клеток, их взаимодействие с внеклеточным матриксом, иммунный статус, что, безусловно, играет важную роль в процессах инвазии и метастазирования [4, 10–13]. Мембранные микродомены опосредуют и процессы программированной клеточной гибели, аккумулируя анти- и проапоптотические мо-

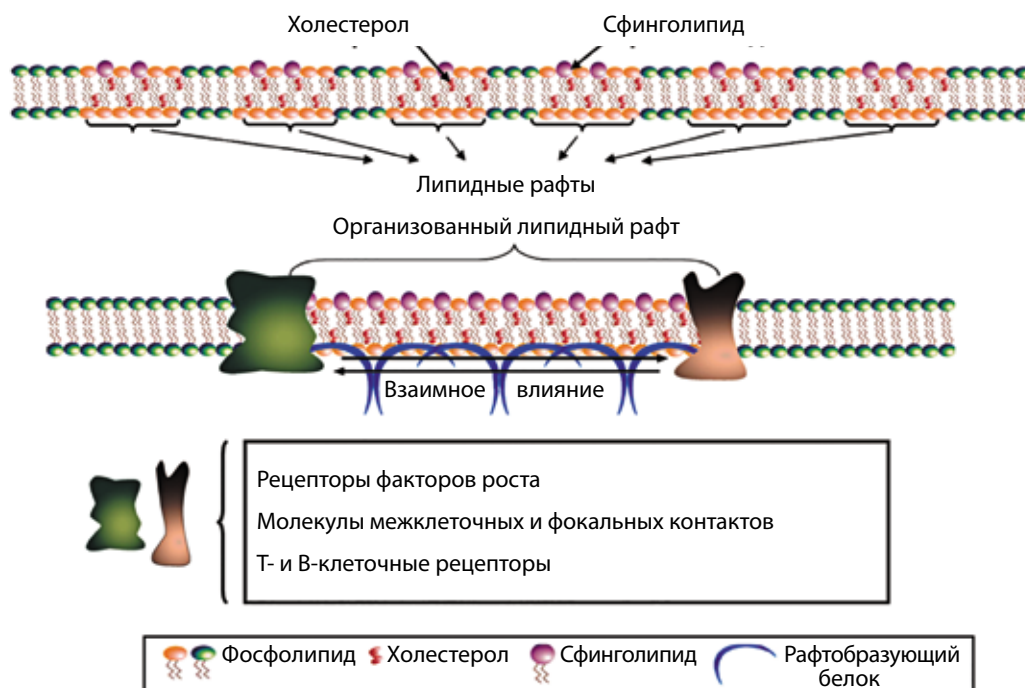


Рис. 1. Липидные «рафты» – микродомены в составе клеточных мембран

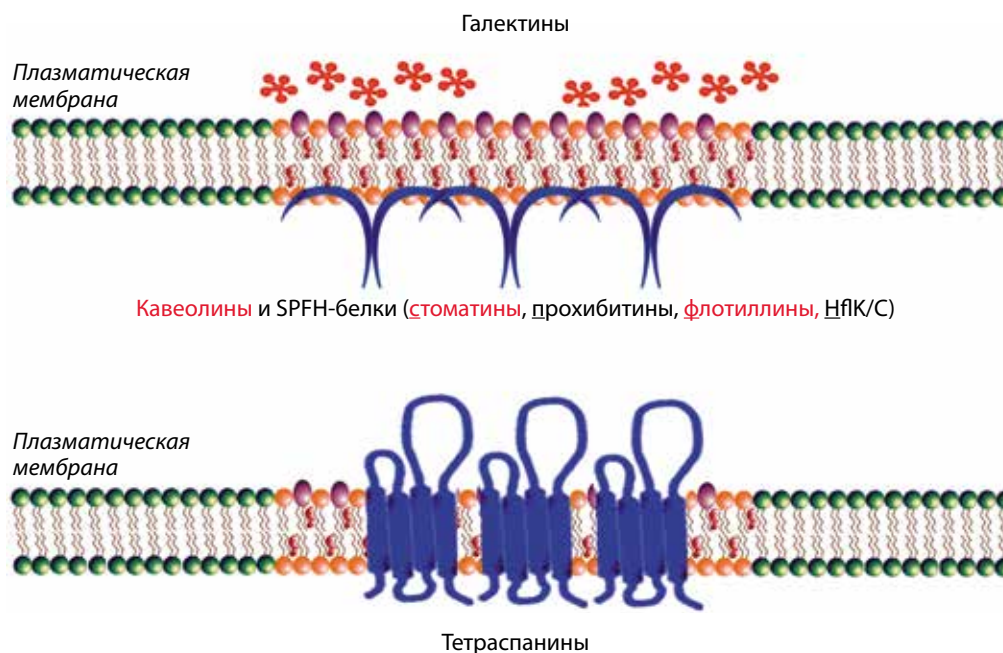


Рис. 2. Разнообразие микродоменобразующих белков

лекулы в специальных структурах CASMER (Cluster of Apoptotic Signaling Molecule-enriched Rafts) [14].

В связи с возрастающим интересом к механизмам везикулярного транспорта и таким мембранным структурам, как экзосомы, следует отметить, что белки липидных рафтов играют важнейшую роль не только в формировании этих внеклеточных микровезикул, но и переносятся с ними в другие, часто отдаленные клетки и ткани, влияя на сигнальную трансдукцию клеток-мишеней [15–17].

Таким образом, липидные рафты осуществляют регуляцию широкого спектра сигнальных каскадов и участвуют практически во всех аспектах жизнедеятельности клетки. Поскольку с современной точки зрения рак является генетическим заболеванием, обусловленным изменениями, вызывающими нарушение молекулярной системы передачи сигналов, изменения в микродоменных мембранных структурах, сопряженные с опухолевой трансформацией и прогрессией, привлекают пристальное внимание молекулярных онкологов и позволяют использовать изменения содержания или нарушения структуры МОБ в качестве диагностических и прогностических молекулярных маркеров в клинической практике.

Однако, несмотря на то, что в последние годы активно проводятся исследования в области строения липидных рафтов, механизмы их функционирования, а следовательно и роль отдельных белковых и липидных компонентов нуждаются в более детальном изучении. Такие исследования предопределяют возможность их эффективного использования для раскрытия механизмов патогенеза целого спектра болезней человека, в том числе диабета, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний.

Краткая характеристика некоторых основных семейств микродоменобразующих белков

Семейство белков кавеолинов является одним из наиболее изученных семейств МОБ и представлено тремя генами – *CAV-1*, *CAV-2* и *CAV-3*, которые с учетом изоформ кодируют 6 белков, имеющих сходное строение. Кавеолины – чрезвычайно «консервативные белки», а их гомологи обнаружены у различных представителей Metazoa [18].

Кавеолин-1 и кавеолин-2 экспрессируются в большинстве тканей, преимущественно в эпителиальных и эндотелиальных клетках, адипоцитах, фибробластах и пневмоцитах. Кавеолин-3 относится к тканеспецифичным белкам и синтезируется исключительно мышечными клетками.

Молекулы кавеолинов частично встроены в ПМ, не пронизывая ее насквозь, а образуя петлю с концами, направленными в сторону цитоплазмы (рис. 3). Они являются принципиальными компонентами кавеол-образных впячиваний ПМ, но могут входить в состав плоских рафтов (рис. 4). Молекулы кавеолина-1 и кавеолина-3 формируют стабильные гомоолигомерные комплексы (как правило, кавеолин-1 формирует гептаолигомеры) [19], однако кавеолин-1 также может формировать гетероолигомерные комплексы с кавеолином-2 [20, 21].

Кавеолин-1 впервые был открыт в качестве субстрата для фосфорилирования тирозинкиназы Src. Этот белок имеет 2 ключевых сайта фосфорилирования, 3 сайта пальмитоилирования по сайту для связывания с актином на каждом конце молекулы и домен CSD (Caveolin Scaffolding Domain). За счет этого специального домена кавеолин-1 и кавеолин-3 могут регуляторно взаимодействовать с широким спектром

белков, таких как EGFR, Src, eNOS, PKC- α и др. Именно при изучении кавеолинов в 1994 г. группа ученых предложила теорию «сигнасомы», согласно которой кавеолин-1 не только поддерживает целостность липидных рафтов, но и формирует платформы, где координиру-

ется и регулируется передача сигналов, а также осуществляется взаимодействие сигнальных белков разных каскадов [22]. За последние годы данная теория нашла множество экспериментальных подтверждений, и важная роль кавеолинов и других МОБ в процессах

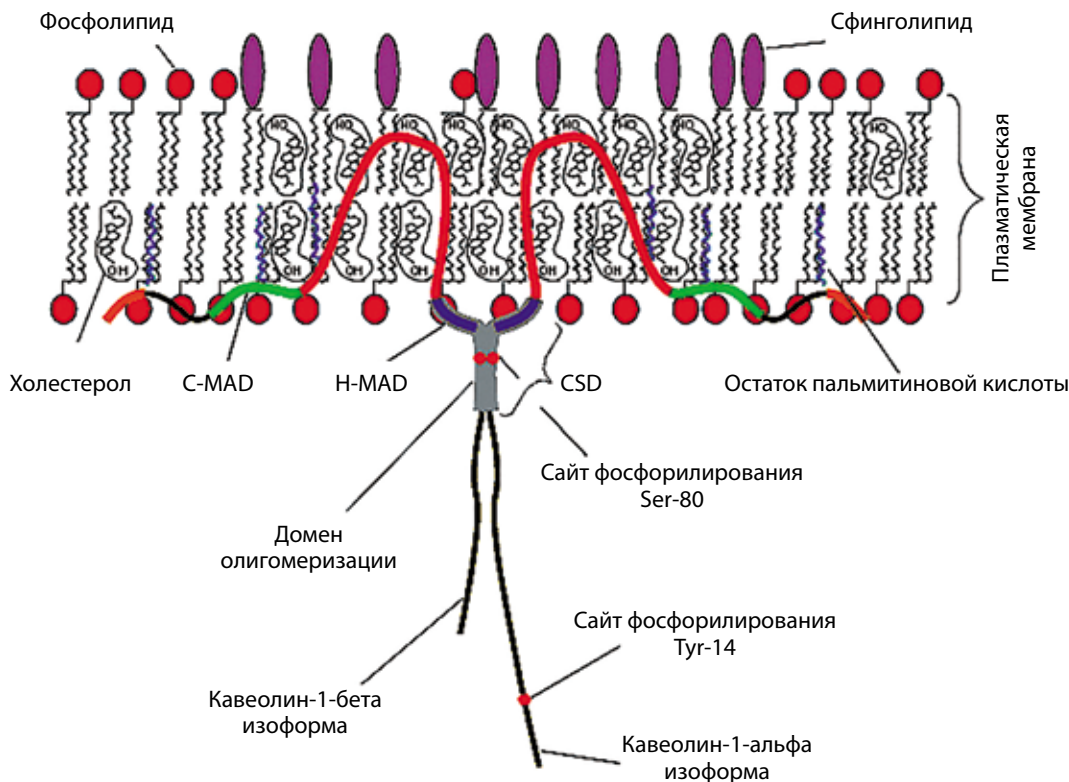


Рис. 3. Структура кавеолина-1 (адаптировано из [22])

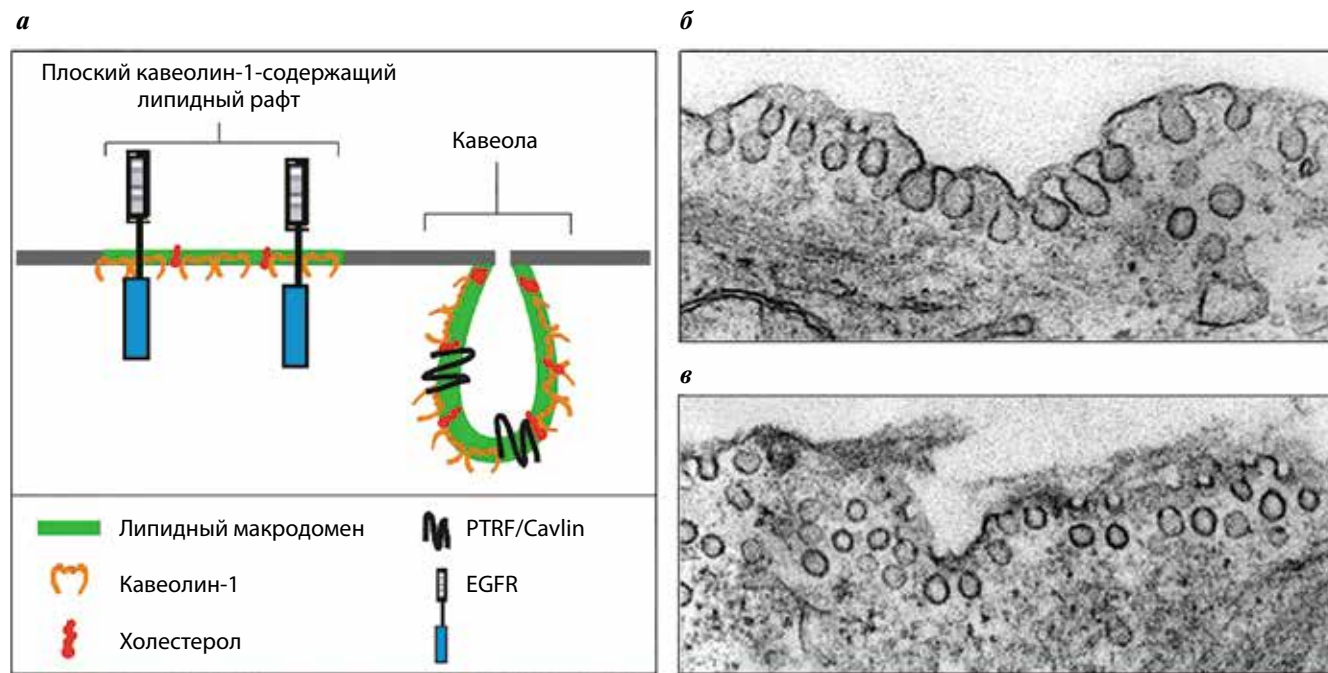


Рис. 4. Типы кавеолинсодержащих липидных микродоменов и их структура: а – схема кавеолинсодержащих микродоменов (адаптировано из [10]; электронная фотография кавеол на срезе, сделанном перпендикулярно (б) и параллельно (в) поверхности миоэпителиальных клеток (адаптировано из [110])

сигнальной трансдукции в нормальных и трансформированных клетках ныне не подвергается сомнению.

Большой интерес исследователей сигнальной трансдукции вызывает влияние МОБ, и в частности кавеолина-1, на активность факторов роста и их рецепторов, однако полученная на данный момент информация достаточно противоречива. Методами коиммунопреципитации и кофракционирования уже довольно давно продемонстрирована кавеолярная локализация EGFR и ERBB2. Более того, в экспериментах *in vitro* выявлено, что кавеолин-1 за счет домена CSD может напрямую взаимодействовать с молекулами EGFR, подавляя трансактивацию последних [23]. Следует отметить, что существуют исследования, в ходе которых не выявлена колокализация EGFR и кавеолина-1 [24], а получены прямо противоположные данные о том, что именно стимуляция клеток EGF приводит к миграции EGFR в кавеолы [25]. Данные противоречия подробно разбираются в обзорах [26, 27].

Воздействие на клетки EGF приводит к Src-зависимому фосфорилированию кавеолина-1 по Tyr14, что привлекает к мембране такие белки, как Csk (ингибитор Src-киназы) и Grb7 (участник Ras-МАРК-каскада) [7, 28]. Неоднократно показано и ингибирующее влияние кавеолина-1 на EGFR-Ras-МАРК-сигнальный путь. Так, кавеолин-1 подавляет активность таких нижележащих участников пути, как Raf-1, MEK-1 и Erk2, причем с MEK-1 и Erk2 кавеолин-1 может связываться непосредственно [8, 29].

Путем формирования сигнальных платформ, компарментализуя, поляризуя, модулируя и интегрируя сигнальные каскады, кавеолы участвуют в процессах клеточной адгезии, динаминзависимого эндоцитоза, регуляции холестерина обмена, поглощения глюкозы, образования и поддержания липидных капель в адипоцитах и др. [4, 7, 21].

Эксперименты на клеточных линиях, нокаутных по гену *CAV-1*, убедительно доказали, что кавеолин-1 — важный участник организации движения и поляризации клеток. Фенотипически клетки демонстрировали явные нарушения актиновой архитектуры, биохимически — повышенную активность Ras и Cdc42 и сниженную активность Rho. В то же время наблюдалась и повышенная активность Src-киназы из-за отсутствия Csk. Известно, что Src активирует Ras и Cdc42 по многим путям и подавляет экспрессию Rho через активацию p190RhoGAP. Восстановление же нормальной экспрессии кавеолина-1 приводило к нормализации как фенотипа клеток, так и активности Src и Rho ГТФаз [30].

При миграции кавеолиновые рафты, как правило, концентрируются в отстающем конце клетки, где они взаимодействуют с актиновым цитоскелетом посредством белка филамин. Однако кавеолин-1, особенно его фосфорилированная форма pTyr14, обнаруживается и на лидирующем конце клетки. Одно из объяснений этого факта заключается в том, что кавеолин-1 является важным участником формирования фокаль-

ных контактов, где он может привлекать к ПМ ингибитор Src-киназы — Csk [31].

На стадии инвазии трансформированные клетки формируют цитоплазматические выросты — инвадоподии, на клеточной поверхности которых локализуются матриксные металлопротеазы (ММП) — ММП-2, ММП-9 и МТ1-ММП (ММП-14). Это обеспечивает эффективное разрушение межклеточного матрикса и направленное продвижение клетки в окружающие ткани. На сегодняшний день существует большое количество работ, описывающих влияние кавеолина-1 на экспрессию и активность ММП, которые оказывают многостороннее влияние на трансформированные клетки и участвуют во всех этапах метастазирования [32, 33]. Во-первых, кавеолин-1 колокализуется с ММП-2 и ММП-14 и при этом может влиять на активность последней, что приводит к снижению активации про-ММП-2 [34, 35]. Во-вторых, в различных типах клеток снижение экспрессии кавеолина-1 ведет к повышению активности и экспрессии ММП-2 и ММП-9 и наоборот [36, 37]. Более того, кавеолин-1 также оказывает влияние на такой мультифункциональный белок, как EMMPRIN (он же CD147 или basigin) [20], регулируя уровень его гликозилирования, что в итоге приводит к подавлению его функции активатора металлопротеаз [38, 39].

Изменениям в функционировании кавеолинов отводится важная роль в регуляции формирования трансформированного и метастатического фенотипов клеток, а его экспрессия неоднократно исследовалась в качестве диагностических и прогностических маркеров в клинических тестах. Надо заметить, что клинические корреляции не всегда однозначны и зависят от множества факторов (гистологического типа опухоли, стадии заболевания и т. д.) [7], что вполне объяснимо с учетом участия кавеолинов в целом ряде как опухолепромотирующих, так и супрессирующих сигнальных путей.

Суперсемейство белков SPFH. Белки семейства SPFH (Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C) также характеризуются большой эволюционной консервативностью и встречаются не только у разнообразных представителей эукариот, но и у бактерий [40]. У млекопитающих семейство SPFH доменсодержащих белков включает флотиллины, прохибитин, стоматин, стоматинподобные белки и эрлины, которые ассоциированы с мембранными микродоменами разных клеточных органелл [11, 41].

Наиболее изученными представителями данного семейства являются флотиллины, открытые в 1997 г. при изучении регенерации аксонов. У человека выявлено 2 белка (флотиллин-1 и флотиллин-2) (рис. 5а), демонстрирующих высокую степень гомологии. В клетке флотиллины преимущественно локализуются в ПМ, но обнаруживаются и в аппарате Гольджи, эндосомах, мультивезикулярных тельцах, лизосомах и фагосомах. Как и кавеолы, олигомеризуясь, они могут формировать впячивания в ПМ, но часто формируют и плос-

кие рафты. Флотиллины экспрессируются практически во всех тканях млекопитающих, но их наибольшее содержание характерно для нервной, жировой, мышечной тканей и эритроцитов. Они играют важную роль во многих физиологических процессах, главным образом благодаря кластеризации рецепторов на мембране (создание «сигнасом»), регуляции клатриннезависимого эндоцитоза и динамики актинового цитоскелета. Флотиллины также участвуют в активации Т-лимфоцитов и процессах поглощения глюкозы [11, 42, 43].

Существуют «сигнасомы», содержащие только белки семейства SPFH, что определяет некоторые особенности в передаче ими клеточных сигналов. Судя по всему, флотиллины осуществляют динаминнезависимый эндоцитоз GPI-заякоренных, а также ряда других белков [11, 44].

В настоящее время заметно увеличилось количество работ, указывающих как на прямую, так и на опосредованную регуляцию флотиллинами процессов адгезии и миграции клеток. Есть данные об обратном влиянии процессов формирования межклеточных контактов и состояния внеклеточного матрикса на экспрессию флотиллинов. Сейчас очевидно, что флотиллиновые микродомены необходимы для сборки, динамической ассоциации и стабилизации кадхериновых комплексов в зоне контактов и активизации кадхеринового сигналинга. При разрушении контактов экспрессия флотиллина-1 сильно снижается, но восстанавливается при образовании связей между клетками [33]. Кроме того, имеются сведения об участии флотиллина-2 совместно с Rab11 и SNX4 в рециклизации E-кадхеринов, по крайней мере в клетках карциномы A431, хотя эти данные требуют подтверждения в других клеточных системах [45]. Флотиллины опосредованно участвуют в ремоделировании актинового цитоскелета и активации Rho ГТФаз [4, 11, 46].

Известно также, что флотиллин-1 оказывает митогенное влияние на клетки. Отмечено, что во время S-фазы клеточного цикла в клетках аденокарциномы простаты человека экспрессия флотиллина-1 достигает

своего пика, и белок транспортируется из ПМ в ядро совместно с белком PTOV-1 (Prostate Tumor Overexpressed). Ядерные функции обоих белков неизвестны, однако гиперэкспрессия PTOV-1 или флотиллина-1 усиливает пролиферацию клеток. Митогенное действие флотиллина-1 может быть также связано с его способностью изменять активность киназы Auroga B, которая необходима для правильного формирования метафазной пластинки и расхождения хромосом во время митоза. Подавление экспрессии *FLOT-1* приводит к уменьшению количества и активности Auroga B киназы, в результате чего нарушается процесс деления, появляются полиядерные клетки и клетки с несколькими веретенами деления. При этом наблюдается значительное снижение скорости пролиферации клеток [47].

Экспрессия флотиллина-2 при опухолевой трансформации клеток также изменяется [11]. Показано, что уровень флотиллина-2 повышается в клетках и метастазах меланомы и коррелирует со стадией опухолевой прогрессии. Гиперэкспрессия флотиллина-2 в низкотуморогенных и низкометастазных линиях меланомы человека резко увеличивает их туморогенность, инвазивность и способность к метастазированию *in vivo*, даже при отсутствии ростовых факторов. При этом наблюдается увеличение количества кровеносных сосудов в формируемых опухолях. Поиск возможных механизмов действия флотиллина-2 на клетки меланомы привел к обнаружению того, что в этих клетках флотиллин-2 взаимодействует с трансмембранным рецептором PAR-1, увеличивая его экспрессию. PAR-1 – трансмембранный рецептор тромбина, связанный с G-белками, который участвует в регуляции многих сигнальных путей, а его повышенная экспрессия является известным фактором неблагоприятного прогноза при меланоме. Гиперэкспрессия PAR-1 и гиперэкспрессия флотиллина-2 в клеточных линиях меланомы вызывают сходные изменения фенотипа клеток [48].

Очевидно, что участие флотиллинов как в злокачественной трансформации клеток, так и в опухолевой

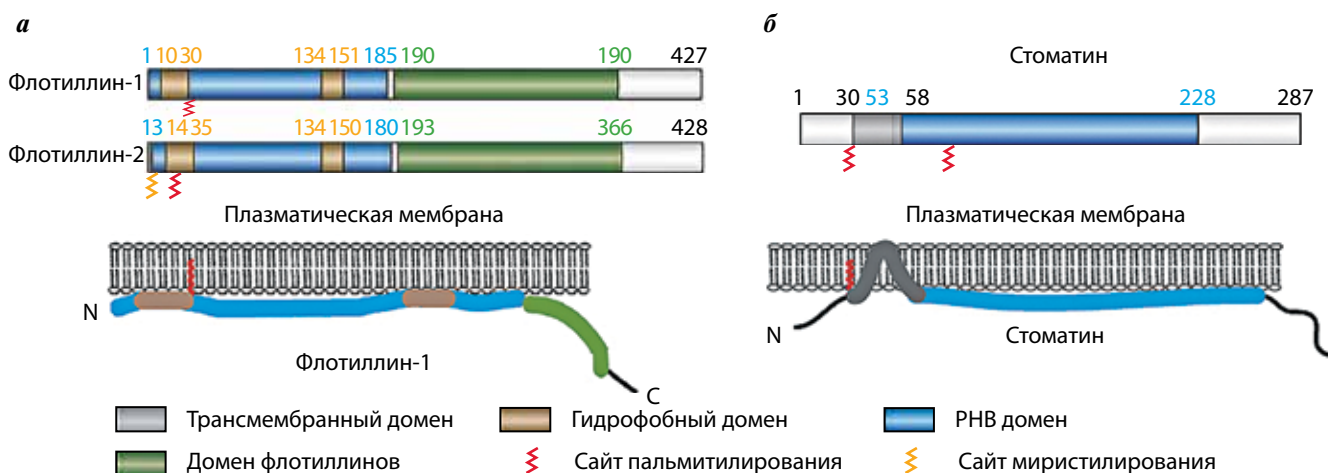


Рис. 5. Структура флотиллинов (а) и стоматина (б) (адаптировано из [42])

прогрессии, при которой приобретение локомоторного фенотипа играет важнейшую роль, может быть обусловлено их способностью влиять на такие процессы, как перестройка актинового цитоскелета и изменение функционирования межклеточных и фокальных контактов, не говоря уже о модулировании и других сигнальных путей.

Стоматин и его гомологи представляют особый подкласс семейства SPFH доменсодержащих белков. Стоматин впервые обнаружен в ПМ эритроцитов в 1982 г. Стоматин экспрессируется во всех типах тканей; наибольшее содержание белка обнаруживается в печени, эритроцитах, скелетных и сердечной мышцах, в то время как ткани легкого, селезенки и головного мозга им обеднены. Как и другие члены SPFH семейства, *STOM* является очень консервативным геном [49, 50].

Стоматин локализуется в липидных рафтах ПМ и выделяется совместно с флотиллинами в составе детергент-устойчивых мембран (рис. 5б). Однако флотиллины и стоматин не копреципитируются и, следовательно, не взаимодействуют друг с другом, локализуясь в разных мембранных микродоменах. Помимо ПМ, стоматин обнаруживается в расположенных около ядра эндо- и лизосомах, а также может ассоциироваться с липидными каплями. Стоматин способен к олигомеризации и образованию комплексов из 9–12 молекул благодаря гидрофобной последовательности из 9 аминокислот на С-конце белка, 3 из которых участвуют также в связывании стоматина с липидными рафтами. Стоматин подвергается фосфорилированию по остатку Ser9 при действии на клетки циклического аденозинмонофосфата, и пальмитоилированию по Cys-29 и Cys-86 [51, 52].

Гомологи стоматина обнаружены в организме позвоночных, беспозвоночных животных и растений. У млекопитающих семейство стоматинов включает стоматинподобные белки SLP-1 (stomatin-like protein 1), SLP-2, SLP-3 и NPHS2 (podocin), имеющие сходные топологию и строение со стоматином. Наибольший уровень экспрессии SLP-1 обнаруживается в сердечной мышце и ткани головного мозга, в то время как SLP-3 экспрессируется только в чувствительных обонятельных нейронах. SLP-2 широко экспрессируется в различных тканях организма, однако наибольший уровень его мРНК обнаруживается в коже, сердечной мышце, печени и поджелудочной железе. Следует отметить, что при высоком уровне гомологии (40–89 %) все белки семейства стоматинов характеризуются уникальной структурой внутриклеточного домена [50].

На сегодняшний день функции стоматина и его гомологов мало изучены. Известно, что они могут модулировать ионный трафик и функционирование митохондрий. Недавно показано, что SLP-2 регулирует экспрессию интерлейкина 2 путем активации NF-κB-ассоциированного сигнального пути, что, возможно, определяет уровень иммунного ответа. Повышение уровня экспрессии стоматинподобных белков связывают с бактериальной и вирусной инфекцией [53].

В последнее время все больше внимания уделяется изучению стоматинподобных белков при злокачественных новообразованиях, поскольку выяснилось, что уровень экспрессии *SLP-2* повышается при раке легкого, пищевода, молочной железы, глотки, эндометрия и др. и коррелирует с размером опухоли, статусом метастазирования, стадией заболевания [54–56], а также с наличием экспрессии рецептора *HER2/neu* в опухолевых клетках [57]. Одновременное повышение уровня экспрессии *SLP-2* и *HER2/neu* при раке молочной железы (РМЖ) являлось гораздо более значимым прогностическим фактором, чем повышенный уровень экспрессии каждого отдельного гена.

О значении белков семейства в везикулярном транспорте известно немного, однако практически все опухолевые экзосомы содержат флотиллины не только в составе мембран, но и внутри секреторируемых микровезикул [15, 16]. По нашим предварительным данным, белки липидных микродоменов дифференциально представлены в микровезикулярной фракции образцов крови больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ): перманентно присутствуют белки *Stom-1*, *Flot1* и *Flot2* и отсутствует белок *Cav-1*. При сравнении «парных» препаратов, полученных от одного и того же пациента, обнаружено, что уровень белков *Stom-1*, *Flot1* и *Flot2* в микровезикулярной фракции крови снижается после удаления первичного опухолевого узла.

Безусловно, выяснение механизмов действия SPFH-семейства белков требует дополнительных исследований, если учесть их влияние на свойства трансформированных клеток и прогрессию опухолей.

Тетраспанины. Семейство тетраспанинов включает большое количество белков, имеющих схожую структуру. Тетраспанины – очень консервативные белки – встречаются у всех Metazoa, у многих грибов и более примитивных организмов [58]. Только у человека выявлено 33 представителя данного семейства. Отдельные представители семейства встречаются во всех типах клеток организма, другие могут быть узкоспециализированными [59].

Как следует из названия белков, они 4 раза пересекают ПМ (см. рис. 2, рис. 6). Все тетраспанины имеют 4 высококонсервативных трансмембранных домена и 2 внеклеточные петли: EC1-короткую и EC2-длинную, содержащие высоковариабельный домен, различающий членов семейства и отвечающий за связь с белками-партнерами. Как и другие МОБ, тетраспанины способны взаимодействовать с холестерином и подвергаться посттрансляционным модификациям, в частности присоединению остатков пальмитиновой кислоты. Большинство тетраспанинов подвергается пальмитоилированию в цистеинобогатых районах, локализованных вблизи трансмембранного домена [60].

На ПМ тетраспанины формируют целые динамические сети, организовывая и объединяя сигнальные молекулы, регулируя их активность и тем самым, как и другие МОБ, участвуя в таких фундаментальных био-

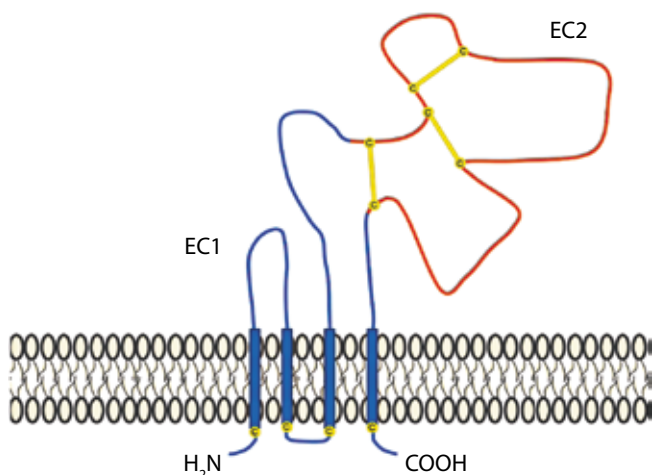


Рис. 6. Структура тетраспанинов. Синим цветом отмечены консервативные домены, красным – высоковариабельный домен, различающий членов семейства и отвечающий за связь с белками-партнерами, желтым – дисульфидные мостики, связывающие цистеин-богатые районы (адаптировано из [60])

логических процессах, как дифференцировка, пролиферация, адгезия, миграция, иммунный ответ и др. Список белков, взаимодействующих с тетраспанинами, чрезвычайно велик и включает интегрины, комплексы гистосовместимости МНС-I и МНС-II, рецепторы ростовых факторов, c-Kit, протеазы MT1-MMP, ADAM и многие другие [61]. В обзоре исследователей из Мельбурна и Брисбейна подробно описаны известные функции 33 тетраспанинов, их связь с процессами опухолевой прогрессии и нарушения экспрессии при различных типах солидных опухолей и гемобластозах [59]. Особое внимание молекулярных онкологов в последние годы привлекли некоторые тетраспанины, в частности TSPAN8, TSPAN24 (CD151) и TSPAN30 (CD63), нарушения экспрессии которых ассоциированы с канцерогенезом.

Известно, что CD151 формирует очень стабильные ламининсвязывающие комплексы с интегринами ($\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ и $\alpha\beta4$) и другими молекулами клеточной мембраны, контролируя тем самым различные процессы, связанные с адгезией и миграцией клеток, а также сохранением тканевой архитектуры [59, 62, 63]. В опытах с ксенографтами глиобластом человека показано, что разрушение таких комплексов приводит к снижению уровня активации EGFR, FAK и малых GTPаз, что, в свою очередь, увеличивает сроки жизни мышей-опухоленосителей [64]. Следует отметить, что FAK может напрямую связываться с тетраспанинами CD151 и CD9 [65].

Повышенная экспрессия некоторых интегринов при ряде онкопатологий является маркером плохого прогноза. Недавно показано, что при НМРЛ, особенно в группе плоскоклеточного рака легкого, суперэкспрессия интегрин $\beta4$ (ITGB4) строго ассоциирована с сосудистой инвазией и с уменьшением сроков общей выживаемости пациентов. На основании анализа панели из 50 генов, включающей компоненты EGFR-

и PI3K-сигнальных путей, авторы, наряду с другими (например, мутантным p53), зафиксировали изменения экспрессии ламинина и CD151 [66]. Экспрессия CD151- $\alpha\beta1$ комплекса может служить прогностическим маркером при HER2-негативном РМЖ [67] и глиобластоме [64]. С учетом того, что тетраспанин CD151, наряду с другими МОБ, активно участвует в формировании сигнальных платформ для интегринов (рис. 7) [68], данные результаты вполне закономерны, а его протуморогенные и прометастатические функции вполне очевидны. Об этом же свидетельствует тот факт, что моноклональные антитела CD151 mAb 9B, диссоциирующие комплекс $\alpha\beta1$ с экстраклеточным доменом CD151, ингибируют ангиогенез, подвижность и инвазивность клеток, что дает возможность рассматривать ингибиторы CD151 в качестве терапевтических агентов [59, 65, 68].

Кроме взаимодействия с интегриннами CD151-содержащие рафты в опухолевых клетках активно аккумулируют рецепторы факторов роста (HGFR, EGFR и TGF- $\beta1$ R) и участвуют в активации MMP (MMP-2, MMP-7 и MMP-9). В последнее время активно обсуждается роль CD151 как фактора, обеспечивающего распределение сигнальных молекул в «сигналосомах» и взаимодействие между рецепторами и их лигандами, которое регулирует процессы инвазии, неоангиогенеза и метастазирования [12, 69, 70].

Отдельные тетраспанины могут влиять на интегрины и миграционные свойства клеток по-разному. Так, суперэкспрессия CD82 (TSPAN27 или KAI1) приводит к сильному снижению подвижности клеток, в то время как повышенные количества CD151 ее ускоряют [71]. CD82 и CD151 могут напрямую взаимодействовать с РКС, причем CD82 негативно регулирует РКС, стимулирующую миграцию, и секвестрирует ее от активирующего действия CD151 [72].

Клинические данные с высокой достоверностью подтверждают экспериментальные исследования о прометастатических свойствах TSPAN8 и TSPAN24 (CD151) [73, 74]. TSPAN8 и CD151 редко обнаруживаются в плазме здоровых доноров и пациентов с другими патологиями, но перманентно выявляются в плазме онкологических больных. Поэтому данные тетраспанины могут служить маркерами наличия рака желудка, толстой и прямой кишки, поджелудочной железы и легкого [59, 74]. Скорее всего, их присутствие в плазме при различных типах опухолей связано с высокой продукцией экзосом.

Следует отметить, что мембраны всех экзосом содержат тетраспанины, которые, возможно, участвуют в сортировке содержимого микровезикул. Существует мнение, что репертуар отдельных тетраспанинов служит «адресом» или же «паролем» для попадания экзосом в определенные типы клеток [13, 40, 75].

По последним данным, представленным группой датских исследователей, анализировавших белковый состав экзосом в группах из 431 образца от больных НМРЛ и 150 образцов доноров с помощью мультимар-

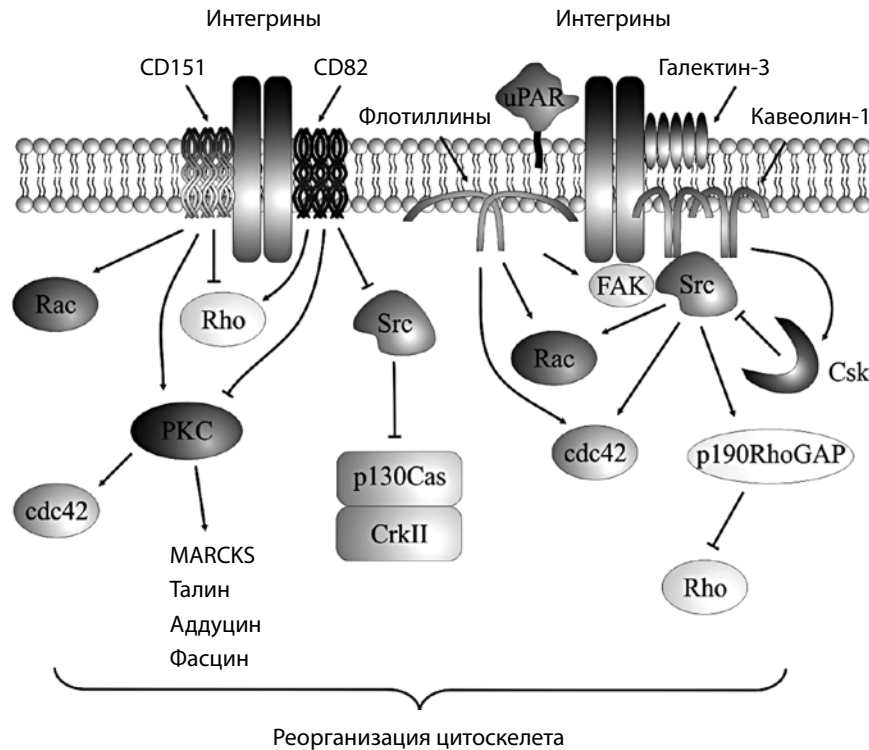


Рис. 7. Роль рафтообразующих белков в регуляции интегринов и их сигнальных путей [12]

керной панели из 49 антител к различным белкам, TSPAN8, CD151 и CD171 входят в группу маркеров, с высокой долей достоверности ($p = 0,0002$) отличающихся в этих группах. Следует отметить, что CD151 детектируется главным образом в экзосомах, продуцируемых клетками аденокарциномы, но не плоскоклеточного рака [76].

Тетраспанины 3, 29 и 30 (CD9, CD81 и CD63) конститутивно представлены в экзосомах и являются их маркерами [15, 17]. Интересно, что CD9 может напрямую взаимодействовать с EGFR, снижая скорость активации последнего [77]. Помимо регуляции трансактивации рецепторов, тетраспанины CD9 и CD81 осуществляют тонкую регуляцию «затухания» сигнала от EGFR. CD81 напрямую взаимодействует с Rac-белками, снижая их инактивацию, что приводит к увеличению миграции клеток [78]. CD151, CD9, TSPAN2 и CD81 часто колокализуются в липидных рафтах и с MMP [70, 79, 80]. Показано, что CD9, TSPAN2 и CD81, не влияя на биосинтез MMP-14, препятствуют ее деградации в лизосомах [79]. Усиленная экспрессия CD9 в клеточной линии мелкоклеточного рака легкого приводит к снижению экспрессии как MMP-2, так и MMP-14 [81]. Кроме того, тот факт, что опухолевые экзосомы, в отличие от нормы, содержат большее количество CD63, согласно последним данным промотирующего эпителиально-мезенхимальный переход и создание преметастатических ниш [80], использование тетраспанинов CD9, CD81 и CD63 в группах сравнения экзосом от онкологических больных требует, на наш взгляд, тщательной проверки и использования адекватных контролей.

Галектины (β -галактозидсвязывающие белки) относятся к семейству лектинов – белков, связывающихся с углеводными «хвостами» N-гликанов и гликобелков. Все галектины имеют 1 или 2 консервативные последовательности CRDs (Carbohydrate Recognition Domains), содержащие около 130 аминокислотных остатков. Взаимодействие димерных или пентамерных галектинов с гликобелками формирует на внешней стороне ПМ специфические сети, обеспечивающие стабилизацию мембранных микродоменов и перекрестные взаимодействия между сигнальными белками [10]. Современные данные о структуре и функции членов семейства галектинов представлены в обзоре I.R. Nabi и соавт. [9]. У млекопитающих описано 15 типов галектинов, и подавляющее большинство имеющихся публикаций посвящено роли галектинов внутри клетки, причем особое место занимают исследования галектина-1, галектина-3 и галектина-4, что связано с их участием в иммунном ответе и злокачественной трансформации. Этим галектинам отводится и роль регуляторов клеточной адгезии и миграции, а значит и процессов метастазирования [9, 10, 82–85]. Повышенную концентрацию галектина-1 и галектина-3 часто обнаруживают в различных типах опухолей человека.

Галектины вносят весомый вклад в регуляцию активности металлопротеаз. Повышение экспрессии галектина-7 приводит к усилению как транскрипции, так и ферментативной активности MMP-2 и MMP-9 [82, 86]. В то же время снижение количества галектина-1 приводит к такому же эффекту [87]. Галектины, помимо влияния на активность металлопротеаз, са-

ми же являются их субстратами. Так, галектин-1 является субстратом MMP-2 и MMP-11 [88], а галектин-3 разрезается как MMP-2, так и MMP-9, что приводит к потере олигомеризации галектинов и повышению сродства к ламинину [89].

Интересно, что могут существовать конкурентные взаимоотношения между ингибирующим взаимодействием EGFR с кавеолином-1 и активирующей связью с галектиновыми рафтами [10]. В клетках РМЖ галектины взаимодействуют с EGFR, защищая его от ингибирующего воздействия кавеолина-1, что приводит к усилению сигнальных каскадов от рецептора и стимуляции опухолевого роста. Стимуляция при участии Gal3 интегринопосредованного RhoA сигналинга и клеточной миграции зависит от фосфорилирования кавеолина-1 (Cav1-P) [90].

Регуляция экспрессии микродоменобразующих белков

Очевидно, что МОБ разных семейств могут совместно участвовать в регуляции сигнальных путей клетки. Что же регулирует сами МОБ? К сожалению, транскрипционная регуляция отдельных МОБ недостаточно изучена, но уже сейчас можно выделить ряд транскрипционных факторов, регулирующих некоторые семейства. Например, p53 и NF-κB участвуют в регуляции тетраспанина CD82 (TSPAN27), кавеолина-1 и галектина-3 [84, 91, 92]. *Flot1* – таргетный ген для p63 и p73 [93] и других транскрипционных факторов [94]. Экспрессия *Flot1* и *Flot2* сильно изменяется и при обработке клеток ретиноевой кислотой. Такой мощный транскрипционный фактор, как Sp1, регулирует кавеолин-1, флотиллин-1 и тетраспанин CD151 [70, 95, 96]. Кавеолин-1 и флотиллин-1 также регулируются транскрипционным фактором Ets-1 [11, 97].

В современной научной литературе существует большое количество работ, посвященных исследованию эпигенетической регуляции белковой экспрессии с помощью микроРНК, но до создания полноценной картины еще очень далеко. Примечательно, что трансляция многих МОБ подавляется одинаковыми микроРНК, причем именно теми, активность которых ассоциирована с канцерогенезом.

miR-124 и miR-138 являются супрессорами опухолевого роста. Потеря экспрессии этих микроРНК усиливает миграцию, инвазию и пролиферацию опухолевых клеток, а также коррелирует с показателями прогрессии злокачественных опухолей различных локализаций и снижением показателей выживаемости пациентов при гепатоцеллюлярной карциноме, РМЖ, раке предстательной железы, прямой кишки, пищевода, поджелудочной железы, мочевого пузыря, почки, шейки матки, а также при гематобластозах и глиомах. Примечательно, что мишенями этих микроРНК являются мРНК генов *FLOT1*, *FLOT2*, и *CAV-1*, причем в 3' UTR мРНК флотиллина-1 miR-124 имеет 39 сайтов связывания. Кроме того, данная микроРНК является негативным регуля-

тором экспрессии выше упоминавшегося транскрипционного фактора Sp1 [84, 98, 99].

МикроРНК-1, теряющая экспрессию в связи с развитием рака легкого, предстательной железы, мочевого пузыря, щитовидной железы, почки, рабдомиосаркомы, гепатоцеллюлярной карциномы и острого миелоидного лейкоза, регулирует экспрессию кавеолина-1, кавеолина-2, флотиллина-2, стоматина, тетраспанина-4 и галектина-3 [84, 98, 100].

Исследовать активность микроРНК в отношении формирования мембранных микродоменов крайне сложно, так как miR-124 и miR-1, например, помимо МОБ имеют более 200 верифицированных мишеней каждая. В их число входят также мРНК других мембранных белков, в частности сиаломуцина (CD164), рецепторов интегрин 1 и EGF, белков цитоскелета, везикулярного транспорта, транскрипционных факторов и многих других.

Сходная ситуация наблюдается и для miR-138, которая является негативным регулятором транскрипции многих генов МОБ, включая *FLOT1*, *FLOT2* и *CAV-1*. Важно, что инактивация этой микроРНК приводит к конститутивной активации NF-κB [101]. Наиболее изученные miR-21 (онкоген) и группа let-7 (микроРНК-онкосупрессоры), изменение экспрессии которых тесно связано с различными этапами опухолевой прогрессии, также регулируют МОБ [84, 100, 102]. Существуют данные о регуляции флотиллина-1 miR-485 и miR-506 [103, 104], флотиллина-2 miR-34a [105] и галектина-3 miR-22 [106]. Вышеупомянутые микроРНК часто обнаруживаются в составе экзосом.

Анализ состава микроРНК экзосом, проведенный с использованием методов глубокого секвенирования 14 (!) библиотек, выявил наличие 593 miR, причем 49 % представлены только 5 микроРНК (miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p, и miR-99b-5p). Среди 20 наиболее часто встречающихся в составе экзосом микроРНК обнаружена и онкосупрессорная miR-181b, регулирующая экспрессию TSPAN8 [107].

Эпигенетическая регуляция генной экспрессии с помощью микроРНК очень сложна. Проведенный нами поиск микроРНК, регулирующих транскрипцию некоторых упомянутых в обзоре тетраспанинов в информационных базах Diana (diana.imis.athena-innovation.gr) и Target Scan (www.targetscan.org) выявил следующее. мРНК маркерных для экзосом тетраспанинов 3 и 29 (CD9, CD81) являются мишенями для 72 и 122 (!) микроРНК, причем только 2 из них – miR-548 и miR-330-5p – совпадают. Интересно, что регуляторами экспрессии TSPAN8, наряду с другими (всего их 33), являются эти же микроРНК. Удивительно, но только 2 из более чем 2500 известных микроРНК человека (miR-124 и miR-506), относящиеся к онкосупрессорам, регулируют транскрипцию CD151, повышенная экспрессия которого тесно связана с опухолевой прогрессией. Следует еще раз подчеркнуть, что мишенями miR-124 являются также мРНК генов *FLOT1*, *FLOT2*, и *CAV-1*, а мишенью miR-506 – *FLOT1*.

Уже упоминавшийся CD63 (TSPAN30), роль которого в онкогенезе неоднозначна, регулируется только одной из известных на сегодняшний день микроРНК – miR-490-3p, изменение экспрессии которой связывают с усилением клеточной пролиферации, миграции и инвазии, а также стимуляцией эпителиально-мезенхимального перехода [108]. Авторы утверждают, что причина этих изменений – тот факт, что мишенью miR-490-3p является *ERGIC3* (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment Protein 3). Неизвестно, входит ли *ERGIC3* в состав микродоменов, но этот белок связан с эндоплазматическим ретикуломом, имеет 2 трансмембранных домена, и его экспрессия часто повышается в клетках самых разных типов эпителиальных опухолей [109]. Поскольку, по последним данным, CD63 также промотирует эпителиально-мезенхимальный переход [80], возникает вопрос, какие взаимоотношения существуют между этими двумя мишенями miR-490-3p.

В данном обзоре мы только обозначили некоторые аспекты регуляции экспрессии МОБ. Данный вопрос нуждается в тщательном и многопрофильном анализе с привлечением экспериментальных, биоинформационных и клинических данных.

Заключение

Таким образом, большинство белков мембранных микродоменов высококонсервативны, широко распространены как в тканях, так и среди разнообразных представителей Metazoa, обладают высокой функциональной активностью, что, безусловно, указывает на их высокую значимость для организма в целом. МОБ являются тонкими регуляторами широкого спектра сигнальных путей, оказывая влияние почти на все аспекты жизнедеятельности клетки, локализуясь и работая преимущественно в ПМ.

Единой картины о многообразии и возможном взаимодействии различных семейств МОБ на сегодняшний день нет. До сих пор принято рассматривать классы МОБ отдельно друг от друга, и имеющиеся данные представляют собой разрозненные публикации, посвященные анализу белков конкретных семейств. Тем не менее, если принимать во внимание наличие ряда общих черт и регуляторных белков-мишеней, функционирование МОБ различных семейств может и должно быть тесно взаимосвязано, и, безусловно, нуждается в комплексном рассмотрении. Тот факт, что нокаутные животные по отдельным представителям описанных семейств жизнеспособны, лишь еще раз подчеркивает функциональную взаимосвязь различных МОБ между собой.

Таким образом, подход, в котором будут учтены особенности взаимодействия или, вероятно, взаимозаменяемости МОБ, в будущем позволит экспериментально выявить пути взаимной регуляции и совместного функционирования разных семейств этих белков, а значит, способствовать значительному углублению знаний о функциях ПМ в целом. Мы стоим на пороге понимания того, как перераспределяются сигналы внутри клетки и как на ПМ «презентируется» клеточное состояние. При изучении МОБ также может быть получен ответ на вопрос, почему разные типы клеток на одинаковые сигналы могут реагировать по-своему. Исследования, посвященные нарушениям функционирования клеточной ПМ в целом и мембранных микродоменов в частности, крайне важны для идентификации механизмов канцерогенеза, регуляции сигнальной трансдукции в опухолевых клетках и поиске новых маркеров прогрессии и мишеней для терапии.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, проект № 14-04-01706А «Роль малых ГТФаз *RalA*, *RalB* и *Arf6*, а также белков липидных микродоменов *Flot1* и *Flot2* в биогенезе и секреции экзосом, продуцируемых неопластическими клетками различного гистогенеза».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(4023): 720–31.
2. Stier A., Sackmann E. Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 1973;311(3):400–8.
3. Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003;32:257–83.
4. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(2):532–45.
5. Nicolson G.L. Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. *Cancer Res* 2015;75(7):1169–76.
6. Веснина Л.Э. Липидные рафты: роль в регуляции функционального состояния клеточных мембран. *Актуальные проблемы современной медицины* 2014;13(2(42)):5–9. [Vesnina L.E. Lipid rafts: role in the regulation of the functional status of cellular membranes. *Aktual'nye problemy suchsnogo meditsiny = Actual Problems Modern Medicine* 2014;132 (42):5–9. (In Russ.)].
7. Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. Caveolae and signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(4): 225–37.
8. Chavan T.S., Muratcioglu S., Marszalek R. et al. Plasma membrane regulates Ras signaling networks. *Cellular logistics* 2015;5(4):e1136374.
9. Nabi I.R., Shankar J., Dennis J.W. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci* 2015;128(13):2213–9.
10. Lajoie P., Goetz J.G., Dennis J.W. et al. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol* 2009;185(3):381–5.

11. Bodin S., Planchon D., Rios Morris E. et al. Flotillins in intercellular adhesion – from cellular physiology to human diseases. *J Cell Sci* 2014;127(Pt 24): 5139–47.
12. Архипова К.А., Зборовская И.Б. Микродомен-образующие белки разных семейств в регуляции общих сигнальных путей клетки. *Биологические мембраны* 2012;29(6):387–99. [Arkhipova K.A., Zborovskaya I.B. Microdomain-forming proteins of different families in the regulation of general signaling cellular pathways. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes* 2012;29 (6):387–99. (In Russ.)].
13. Rocha-Perugini V., Sanchez-Madrid F., Martinez Del Hoyo G. Function and Dynamics of Tetraspanins during Antigen Recognition and Immunological Synapse Formation. *Front Immunol* 2015;6:653.
14. Mollinedo F., Gajate C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul* 2015;57:130–46.
15. Villarroya-Beltri C., Baixauli F., Gutierrez-Vazquez C. et al. Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014;28:3–13.
16. Iraci N., Leonardi T., Gessler F. et al. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):171.
17. Zhang H.G., Grizzle W.E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am J Pathol* 2014;184(1):28–41.
18. Kirkham M., Nixon S.J., Howes M.T. et al. Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis. *J Cell Sci* 2008;121(Pt 12):2075–86.
19. Fernandez I., Ying Y., Albanesi J. et al. Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(17):11193–8.
20. Williams T.M., Lisanti M.P. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004;5(3):214.
21. Bastiani M., Parton R.G. Caveolae at a glance. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 22):3831–6.
22. Lisanti M.P., Scherer P.E., Tang Z. et al. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 1994;4(7):231–5.
23. Couet J., Sargiacomo M., Lisanti M.P. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 1997;272(48):30429–38.
24. Roepstorff K., Thomsen P., Sandvig K. et al. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem* 2002;277(21):18954–60.
25. Matveev S.V., Smart E.J. Heterologous desensitization of EGF receptors and PDGF receptors by sequestration in caveolae. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282(4):935–46.
26. Pike L.J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746(3):260–73.
27. de Laurentiis A., Donovan L., Arcaro A. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J* 2007;1:12–32.
28. Lee H., Volonte D., Galbiati F. et al. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site(Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 2000;14(11):1750–75.
29. Engelman J.A., Zhang X.L., Razani B. et al. p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J Biol Chem* 1999;274(45):32333–41.
30. Grande-Garcia A., Echarri A., de Rooij J. et al. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 2007;177(4):683–94.
31. Beardsley A., Fang K., Mertz H. et al. Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 2005;280(5): 3541–7.
32. Yu H., Shen H., Zhang Y. et al. CAV1 promotes HCC cell progression and metastasis through Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS One* 2014, 9(9):e106451.
33. Brown G.T., Murray G.I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 2015;237(3):273–81.
34. Han F., Zhu H.G. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010;159(1): 443–50.
35. Aga M., Bradley J.M., Wanchu R. et al. Differential effects of caveolin-1 and -2 knockdown on aqueous outflow and altered extracellular matrix turnover in caveolin-silenced trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(9):5497–509.
36. Williams T.M., Medina F., Badano I. et al. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis *in vivo*. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase(MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem* 2004;279(49):51630–46.
37. Jia L., Wang S., Zhou H. et al. Caveolin-1 up-regulates CD147 glycosylation and the invasive capability of murine hepatocarcinoma cell lines. *Int J Biochem Cell B* 2006;38(9):1584–93.
38. Tang W., Hemler M.E. Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* 2004;279(12):11112–8.
39. Muramatsu T. Basigin(CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem* 2016;159(5):481–90.
40. Andreu Z., Yáñez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014;5:442.
41. Rivera-Milla E., Stuermer C.A., Malaga-Trillo E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell Mol Life Sci* 2006;63(3):343–57.
42. Browman D.T., Hoegg M.B., Robbins S.M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell B* 2007;17(8):394–402.
43. Stuermer C.A. The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell B* 2010;20(1):6–13.
44. Chowdhury I., Thompson W.E., Thomas K. Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *J Cell Physiol* 2014;229(8):998–1004.
45. Solis G.P., Hulsbusch N., Radon Y. et al. Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Mol Biol Cell* 2013;24(17):2689–702.
46. Koch J.C., Solis G.P., Bodrikov V. et al. Upregulation of reggie-1/flotillin-2 promotes axon regeneration in the rat optic nerve *in vivo* and neurite growth *in vitro*. *Neurobiol Dis* 2013;51:168–76.
47. Gomez V., Sese M., Santamaria A. et al. Regulation of aurora B kinase by the lipid raft protein flotillin-1. *J Biol Chem* 2010;285(27):20683–90.
48. Hazarika P., McCarty M. F., Prieto V.G. et al. Up-regulation of Flotillin-2 is associated with melanoma progression and modulates expression of the thrombin receptor protease activated receptor 1. *Cancer Res* 2004;64(20):7361–9.
49. Gallagher P.G., Romana M., Lieman J.H. et al. cDNA structure, tissue-specific expression, and chromosomal localization of the murine band 7.2b gene. *Blood* 1995;86(1):359–65.
50. Lapatsina L., Brand J., Poole K. et al. Stomatin-domain proteins. *Eur J Cell Biol* 2012;91(4):240–5.
51. Snyers L., Umlauf E., Prohaska R. Oligomeric nature of the integral membrane protein stomatin. *J Biological Chem* 1998;273(27):17221–6.
52. Umlauf E., Mairhofer M., Prohaska R. Characterization of the stomatin domain involved in homo-oligomerization and lipid raft association. *J Biol Chem* 2006;281(33):23349–56.
53. Chi H., Hu Y.H. Stomatin-like protein 2 of turbot *Scophthalmus maximus*: Gene cloning, expression profiling and immunoregulatory properties. *Fish Shellfish Immunol* 2016;49:436–41.
54. Chang D., Ma K., Gong M. et al. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2010;15(2):104–10.

55. Zhang L., Ding F., Cao W. et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed in cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(5):1639–46.
56. Cui Z., Zhang L., Hua Z. et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed and related to cell growth in human endometrial adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2007;17(4):829–33.
57. Cao W., Zhang B., Li J. et al. SLP-2 overexpression could serve as a prognostic factor in node positive and HER2 negative breast cancer. *Pathology* 2011;43(7):713–8.
58. Huang S., Tian H., Chen Z. et al. The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evol Biol* 2010;10:306.
59. Detchokul S., Williams E. D., Parker M. W. et al. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *Br J Pharmacol* 2014;171(24):5462–90.
60. Beckwith K.A., Byrd J.C., Muthusamy N. Tetraspanins as therapeutic targets in hematological malignancy: a concise review. *Front Physiol* 2015;6:91.
61. Levy S., Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology* 2005;20:218–24.
62. Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 23):4143–51.
63. Kumari S., Devi G. t., Badana A. et al. CD151-A Striking Marker for Cancer Therapy. *Biomark Cancer* 2015;7:7–11.
64. Zhou P., Erfani S., Liu Z. et al. CD151-alpha3beta1 integrin complexes are prognostic markers of glioblastoma and cooperate with EGFR to drive tumor cell motility and invasion. *Oncotarget* 2015;6(30):29675–93.
65. Qin Y., Mohandessi S., Gordon L. et al. Regulation of FAK Activity by Tetraspan Proteins: Potential Clinical Implications in Cancer. *Crit Rev Oncog* 2015;20(5–6):391–405.
66. Stewart R.L., West D., Wang C. et al. Elevated integrin alpha6beta4 expression is associated with venous invasion and decreased overall survival in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 2016;54:174–83.
67. Romanska H. M., Potemski P., Kusinska R. et al. Expression of CD151/Tspan24 and integrin alpha 3 complex in aid of prognostication of HER2-negative high-grade ductal carcinoma in situ. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(8):9471–8.
68. Ke A.W., Zhang P.F., Shen Y.H. et al. Generation and characterization of a tetraspanin CD151/integrin alpha6beta1-binding domain competitively binding monoclonal antibody for inhibition of tumor progression in HCC. *Oncotarget* 2016;7(5):6314–22.
69. Berditchevski F., Odintsova E. ErbB receptors and tetraspanins: Casting the net wider. *Int J Biochem Cell B* 2016;7(Pt A):68–71.
70. Sadej R., Grudowska A., Turczyk L. et al. CD151 in cancer progression and metastasis: a complex scenario. *Lab Invest* 2014;94(1):41–51.
71. Hong I.K., Jin Y.J., Byun H.J. et al. Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J Biol Chem* 2006;281(34):24279–92.
72. Miranti C.K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis. *Cellular Signalling* 2009;21(2):196–211.
73. Nazarenko I., Rana S., Baumann A. et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010;70(4):1668–78.
74. Yue S., Mu W., Erb U. et al. The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding. *Oncotarget* 2015;6(4):2366–84.
75. Rana S., Zöller M. The Functional Importance of Tetraspanins in Exosomes Emerging Concepts of Tumor Exosomes-Mediated Cell-Cell Communication. Edited by Z.-H. Zhang. Springer Science + Business Media. New York, 2013. Pp. 69–106.
76. Sandfeld-Paulsen B., Jakobsen K.R., Baek R. et al. Exosomal Proteins as Diagnostic Biomarkers in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016.
77. Murayama Y., Shinomura Y., Oritani K. et al. The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol* 2008;216(1):135–43.
78. Tejera E., Rocha-Perugini V., Lopez-Martin S. et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell* 2013;24(3):261–73.
79. Lafleur M.A., Xu D., Hemler M.E. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009;20(7):2030–40.
80. Seubert B., Cui H., Simonavicius N. et al. Tetraspanin CD63 acts as a pro-metastatic factor via beta-catenin stabilization. *Int J Cancer* 2015;136(10):2304–15.
81. Saito Y., Tachibana I., Takeda Y. et al. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(19):9557–65.
82. Cao Z.Q., Guo X.L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* 2016;7(5):314–24.
83. Wang L., Guo X.L. Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression. *Biomed Pharmacother* 2016;78:165–71.
84. Timoshenko A.V. Towards molecular mechanisms regulating the expression of galectins in cancer cells under microenvironmental stress conditions. *Cell Mol Life Sci* 2015;2(22):4327–40.
85. Argueso P., Mauris J., Uchino Y. Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer. *Tissue Barriers* 2015;3(3):e1026505.
86. Demers M., Magnaldo T., Stpierre Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res* 2005;65(12):5205–10.
87. Wu M.H., Hong T.M., Cheng H.W. et al. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009;7(3):311–8.
88. Prudova A., auf dem Keller U., Butler G.S. et al. Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(5):894–911.
89. Ochieng J., Green B., Evans S. et al. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1379(1):97–106.
90. Goetz J.G., Joshi B., Lajoie P. et al. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell B* 2008;180(6):1261–75.
91. Bist A., Fielding C.J., Fielding P.E. p53 regulates caveolin gene transcription, cell cholesterol, and growth by a novel mechanism. *Biochemistry* 2000;39(8):1966–72.
92. Dumic J., Lauc G., Flogel M. Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB. *Cell Physiol Biochem* 2000;10(3):149–58.
93. Sasaki Y., Oshima Y., Koyama R. et al. Identification of flotillin-2, a major protein on lipid rafts, as a novel target of p53 family members. *Mol Cancer Res* 2008;6(3):395–406.
94. Banning A., Ockenga W., Finger F. et al. Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes. *PLoS One* 2012;7(9):e45514.
95. Cao S., Fernandez-Zapico M.E., Jin D. et al. KLF11-mediated repression antagonizes Sp1/sterol-responsive element-binding protein-induced transcriptional activation of caveolin-1 in response to cholesterol signaling. *J Biol Chem* 2005;280(3):1901–10.
96. Wang J., Liu X., Ni P. et al. SP1 is required for basal activation and chromatin accessibility of CD151 promoter in liver cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393(2):291–6.
97. Kathuria H., Cao Y.X., Ramirez M.I. et al. Transcription of the caveolin-1 gene is differentially regulated in lung type I epithelial and endothelial cell lines. A role for ETS proteins in epithelial cell expression. *J Biol Chem* 2004;279(29):30028–36.

98. Hoshino I., Matsubara H. MicroRNAs in cancer diagnosis and therapy: from bench to bedside. *Surgery today* 2013;43(5):467–78.
99. Butz H., Szabo P.M., Khella H.W. et al. miRNA-target network reveals miR-124 as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1. *Oncotarget* 2015;6(14):12543–57.
100. Sygitowicz G., Tomaniak M., Blaszczyk O. et al. Circulating microribonucleic acids miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results. *Arch Cardiovasc Dis* 2015;108(12):634–42.
101. Gong H., Song L., Lin C. et al. Down-regulation of miR-138 sustains NF-kappaB activation and promotes lipid raft formation in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1083–93.
102. Wu L., Zhao Q., Zhu X. et al. A novel function of microRNA let-7d in regulation of galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain. *Brain Pathol* 2010;20(6):1042–54.
103. Kang M., Ren M.P., Zhao L. et al. miR-485-5p acts as a negative regulator in gastric cancer progression by targeting flotillin-1. *Am J Transl Res* 2015;7(11):2212–22.
104. Yang F.Q., Zhang H.M., Chen S.J. et al. MiR-506 is down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and inhibits cell growth and metastasis via targeting FLOT1. *PLoS One* 2015;10(3):e0120258.
105. Liu R., Xie H., Luo C. et al. Identification of FLOT2 as a novel target for microRNA-34a in melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(6):993–1006.
106. Yang Q., Jiang W., Zhuang C. et al. microRNA-22 downregulation of galectin-9 influences lymphocyte apoptosis and tumor cell proliferation in liver cancer. *Oncology reports* 2015;34(4):1771–8.
107. Huang X., Yuan T., Tschannen M. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013;14:319.
108. Zhang L.Y., Liu M., Li X. et al. miR-490-3p modulates cell growth and epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by targeting endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 (ERGIC3). *J Biol Chem* 2013;288(6):4035–47.
109. Lin Q.H., Zhang K.D., Duan H.X. et al. ERGIC3, which is regulated by miR-203a, is a potential biomarker for non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2015;106(10):1463–73.
110. Sandvig K., Torgersen M.L., Raa H.A. et al. Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 2008;129(3):267–76.

Вторые первичные опухоли у онкологических больных: эпидемиология, роль противоопухолевой терапии

Л. Г. Соленова

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Лия Геннадьевна Соленова lsolenova@mail.ru

В последние годы в лечении онкологических больных достигнуты существенные успехи, которые привели к улучшению показателей выживаемости и более длительной продолжительности жизни. В связи с этим все большую актуальность приобретает изучение отдаленных результатов противоопухолевой терапии, особенно риска развития вторых первичных опухолей. Больные, получившие лечение по поводу первого злокачественного новообразования, остаются в группе повышенного риска развития второй опухоли на протяжении всей последующей жизни. В обзоре приведены данные аналитических эпидемиологических исследований, посвященных изучению вторых гемобластозов и солидных опухолей, обусловленных последствиями противоопухолевого лечения с использованием лучевой терапии, алкилирующих агентов. Рассмотрены данные, отражающие риск развития вторых опухолей, возникших после трансплантации стволовых клеток. В этиологии вторых опухолей не исключается роль и других значимых факторов риска: генетической предрасположенности, курения, употребления алкоголя, несбалансированного питания и др. В совокупности с последствиями противоопухолевого лечения они могут существенно влиять на вероятность развития вторых опухолей у онкологических больных, что необходимо учитывать при разработке профилактических мероприятий. Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о необходимости кооперации специалистов разного профиля с использованием клинических, эпидемиологических, молекулярных подходов для изучения механизмов канцерогенеза первых и вторых опухолей, выбора эффективных, но наиболее щадящих методов противоопухолевой терапии для снижения риска ее отдаленных последствий и их профилактики.

Ключевые слова: онкологические больные, вторые опухоли, факторы риска, противоопухолевая терапия, алкилирующие агенты, таргетные препараты, профилактика

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-30-43

Second primary malignancies in cancer survivors: epidemiology, role of anticancer therapy

L. G. Solenova

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russia

The recent years have seen considerable advancement in the therapy of oncology patients and hence better survival and longer lifespan. Thus, studies on the distant effects of antitumor therapy have become increasingly important. That particularly concerns the risk of development of the second primary tumors. The patients that received therapy for the first malignant neoplasm become a higher-risk group for the development of a second tumor for their entire subsequent life. The review represents the data of analytical epidemiological studies on the second leukemia and solid tumors caused by the aftereffects of antitumor therapy using alkylating agents. Data are also considered on the risk of the second tumors that developed upon transplantation of stem cells. The second tumor etiology includes other significant risk factors such as genetic predisposition, smoking, alcohol consumption, imbalanced diet, etc. In combination with the aftereffects of antitumor therapy they may influence significantly the probability of the development of the second tumors in cancer patients, which should be considered in developing preventive measures. The review data suggest the need for cooperation of specialists in various fields and the use of clinical, epidemiological and molecular approaches to study the carcinogenesis of the first and second tumors, the choice of efficient and the safest methods of antitumor therapy to reduce the risk of the development of distant aftereffects and their prevention.

Key words: cancer patients, second tumors, risk factors, anticancer therapy, alkylating agents, target therapy, prevention

Успехи в ранней диагностике и лечении злокачественных новообразований (ЗН) привели к более длительной продолжительности жизни онкологических больных, что является индикатором эффективности системы здравоохранения в целом. В России 5-летняя выживаемость онкологических больных выросла с 49,1 % в 1998 г. до 52,9 % в 2015 г. [1, 2]. Эти данные совпадают с европейскими, согласно которым средняя 5-летняя выживаемость в 1988–1999 гг. немного превышала 50 %

[3]. Данные самого большого кооперативного исследования в Европе (EUROCORE) свидетельствуют об изменениях в диагностике, лечении ЗН, а также в реабилитации онкологических больных, что существенно повлияло на их выживаемость. С 1999–2001 по 2005–2007 гг. значительные успехи были достигнуты в выживаемости больных раком предстательной железы (81,7 %), неходжкинской лимфомой (НХЛ) (60,4 %), раком прямой кишки (57,6 %). Показатели сильно ва-

рыруют по разным странам и регионам [4]. В США с 1971 г. за 30 лет число выживающих больных увеличилось втрое при ежегодном приросте их числа 2 %. В 2001 г. их насчитывалось около 10 млн человек, что составило 3,5 % всего населения США. Показатель относительной 5-летней выживаемости среди всех онкологических пациентов США составлял 66 % [5]. Для сравнения: в 1974–1976 гг. в США этот показатель был равен 50 % [6].

Впоследствии у пациентов с онкологическими заболеваниями, прошедших курсы противоопухолевой терапии, могут возникнуть разные проблемы со здоровьем, наиболее серьезная из них – развитие повторных онкологических заболеваний. При описании этих опухолей в отечественной и зарубежной научной литературе наблюдаются терминологические расхождения. Используются термины: первично-множественные злокачественные новообразования (ПМЗН) и вторые злокачественные опухоли, которые, по-существу, являются метакхронными ПМЗН с определенным временным интервалом между выявлением второй опухоли от момента диагноза первой опухоли. Оба термина означают процесс независимого возникновения и развития у одного больного 2 и более новообразований. При этом каждая опухоль имеет определенные признаки злокачественности, характерные для данной локализации, и не является рецидивом или метастазом предшествующей опухоли в случае вторых и последующих первичных опухолей. При рассмотрении этиологии метакхронных ПМЗН или вторых первичных опухолей указываются одни и те же факторы: генетическая обусловленность, экологические условия, факторы образа жизни, лучевое и химиотерапевтическое воздействие при лечении первых опухолей [7–15]. Национальный институт онкологии США в 1985 г. опубликовал монографию, посвященную первично-множественным опухолям в Коннектикуте и Дании в 1935–1982 гг. по данным популяционных канцер-регистров этих территорий. В ней термины «метакхронные ПМЗН» и «вторые опухоли» употребляются в одном и том же контексте, а именно, когда речь идет о последующем развитии и выявлении вторых первичных опухолей у онкологических больных [16]. По мнению некоторых авторов, различия между этими терминами носят семантический характер, в принципе не влияющий на показатели риска возникновения данных опухолей. Осложняют сравнительный анализ эпидемиологии ПМЗН различные временные критерии отнесения вторых опухолей к метакхронным, применяемые в разных канцер-регистрах и странах [17]. Согласно рекомендациям Международного агентства по изучению рака (МАИР) к ним следует относить вторые первичные опухоли, выявляемые не ранее 2 мес после выявления первой опухоли [18]. По критериям, принятым в России, метакхронными условно считаются опухоли, выявляемые спустя 6 мес и более после обнаружения первой опухоли [13]. Эти разночтения могут сказываться на показателях

риска, снижая их в случае применения, например, более широкого временного интервала между выявлением первых и вторых опухолей [17].

В России в 2015 г. число впервые выявленных ПМЗН составило 39 195 случаев, из них 28 800 были метакхронными опухолями, что составило 4,9 % всех впервые выявленных ЗН. К сожалению, имеющаяся в отечественных официальных источниках информация об этих опухолях весьма ограничена для проведения детального анализа, касающегося нозологии опухолей, возраста заболевших и других характеристик [2]. С ростом продолжительности жизни онкологических больных такой анализ приобретает все большую необходимость, так как больные, получившие лечение по поводу первого ЗН, остаются группой риска развития второй опухоли на протяжении всей последующей жизни. Актуальность и остроту данной проблемы определяют следующие сопряженные между собой аспекты:

- эпидемиологическая оценка риска развития вторых опухолей при наличии первой опухоли;
- более глубокое понимание механизмов канцерогенеза как основы для создания новых противоопухолевых препаратов;
- разработка индивидуальных и популяционных мер профилактики, которая может включать применение более щадящих схем химиотерапии, скрининг и раннее выявление вторых опухолей, а также их лечение на ранних стадиях.

Таким образом, профилактика вторых опухолей представляет собой синтез результатов текущих исследований, которые охватывают весь спектр вопросов, относящихся к первым и вторым первичным опухолям и связям между ними [17].

Методы оценки риска вторых первичных злокачественных новообразований

Большинство исследований вторых первичных ЗН, связанных с лечением первых, выполнено с применением 2 классических эпидемиологических методов: когортного и случай–контроль. При использовании когортного метода в когорту включаются онкологические пациенты с точно верифицированным диагнозом, отвечающие определенным критериям, например, все больные спустя 1 год с момента постановки диагноза первого ЗН. Далее следует ретроспективное или проспективное прослеживание жизненного статуса пациентов. Источниками информации могут быть популяционные региональные или национальные канцер-регистры. Основным недостатком этой информации является то, что данные о лечении пациента в канцер-регистре часто ограничиваются первоначальным курсом терапии без его детализации, т. е. указания препаратов, доз и продолжительности лечения. В этом отношении госпитальные канцер-регистры и специальные клинические исследования, проводимые по протоколам, предоставляют больше информации, но есть опасность недостаточно длительного прослеживания пациентов.

Если же больных со вторыми опухолями прослеживают более тщательно, чем тех, у кого они не выявлены, то не исключено завышение показателей риска вторых ЗН. Как правило, при когортном исследовании для сравнения и расчета показателей риска возникновения вторых опухолей служат данные по заболеваемости общего населения. Показателем риска является стандартизованное отношение заболеваемости и его 95 % доверительный интервал (ДИ).

Исследования методом случай-контроль внутри когорты, или методом вложенной выборки (nested case-control), дают возможность изучить роль лечения в возникновении вторых ЗН и количественные дозо-ответные связи с кумулятивной дозой препаратов. При этом типе исследования случаи вторых опухолей выбираются из когорты живых онкологических больных. Из нее же подбираются случайным способом из стратифицированных групп и контрольные лица, не имеющие вторых опухолей, затем сравниваются методы лечения в обеих группах. Подбор направлен на обеспечение сопоставимости опытной (в данном случае лиц со вторыми опухолями) и контрольной групп по мешающим факторам. Возможны ситуации, когда уравниваемый мешающий фактор не является таковым, например стадия заболевания, определяющая характер терапии. Это ведет к возможному снижению статистической значимости выявленных связей. Таким образом, оба эпидемиологических метода имеют свои преимущества и недостатки, которые следует учитывать при планировании, проведении и оценке исследований. Строгость подхода к отбору эпидемиологических данных продемонстрирована в работе по оценке риска возникновения вторых опухолей после первого рака молочной железы (РМЖ). Из 710 статей, опубликованных по этой проблеме к июню 2013 г., авторы отобрали 15, корректно отражающих результаты ретроспективных когортных исследований. Метаанализ объединенных результатов выявил на 17 % повышенный по сравнению со здоровыми женщинами риск вторых опухолей различных локализаций, за исключением РМЖ [19].

Факторы риска развития вторых опухолей у онкологических больных

В этиологии вторых первичных опухолей могут участвовать генетические, гормональные факторы, а также факторы образа жизни (курение, злоупотребление алкоголем, несбалансированное питание) и окружающая среда. Существенная этиологическая роль отводится лучевому, гормональному лечению и химиотерапии первых опухолей [7]. Возможны различные комбинации и взаимодействие указанных факторов, в связи с этим ПМЗН могут представлять модель для понимания комплексной этиологии рака человека для создания и тестирования гипотез механизмов канцерогенеза [20].

Существуют наследственные синдромы, при наличии которых риск некоторых локализаций ЗН значи-

тельно повышен. Семейные раковые синдромы часто связаны не с одним, а с несколькими типами рака. При наличии синдрома Линча существует высокий риск развития рака толстой и прямой кишки, эндометрия, мочевого пузыря и некоторых других опухолей. Женщины с наследственным синдромом РМЖ, который ассоциирован с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*, имеют высокий риск и РМЖ и рака яичников, а также некоторых других ЗН [15, 21, 22].

Известно, что у некоторых онкологических больных существует повышенный риск развития рака в том же или прилегающих органах. Это может объясняться тем, что в некоторых случаях весь орган (а иногда прилегающие к нему органы и ткани) подвергались воздействию канцерогенных факторов, приведших к развитию первого рака, т.е. вся эта область уже могла иметь ранние изменения, ведущие впоследствии к развитию второго рака. Явление получило название полей канцеризации, или опухолевого поля — образование протяженных районов, содержащих генетически измененные клетки. Существование полей канцеризации подтверждено для разных типов рака: толстой и прямой кишки, РМЖ, легкого, мочевого пузыря, желудка, головы и шеи, кожи [23, 24].

Хорошо изучена роль поведенческих факторов (курение, потребление алкоголя, несбалансированное питание, репродуктивное поведение), наличия вируса папилломы человека в этиологии целого ряда ЗН. У больных раком гортани более высок риск развития рака и других локализаций: полости рта, глотки, пищевода, легкого, мочевого пузыря, — при которых ведущая этиологическая роль принадлежит курению. Например, при первом раке легкого, риск второго рака той же локализации при курении повышается в полтора раза, опухолей полости рта — в 2,5 раза; при первом раке гортани риск рака легкого повышается в 3,2 раза, опухолей ротовой полости — в 2,7 раза [7]. Показано, что курение — независимый фактор риска рака легкого у женщин, леченных по поводу РМЖ [25]. Метаанализ результатов 13 эпидемиологических исследований женщин с первым РМЖ выявил статистически значимое повышение риска развития второго первичного РМЖ, эндометрия, толстой и прямой кишки, связанное повышенным индексом массы тела и тучностью женщин [26].

Существенная роль в возникновении вторых опухолей отводится терапии первых опухолей [27]. Развитие ЗН может занять многие годы, поэтому вторые опухоли лучше всего изучены для тех типов первых ЗН, лечение которых наиболее успешно и обеспечивает длительную выживаемость онкологических больных.

Лучевая терапия признана как потенциальная причина рака много лет назад. Наиболее частым негативным последствием имевшего место в прошлом ионизирующего облучения является развитие различных видов лейкоза, главным образом — острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лей-

коза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). С этим же фактором связано развитие миелодиспластического синдрома (МДС), который со временем может перейти в острый лейкоз. В большинстве случаев эти опухоли возникают спустя несколько лет (пик заболеваемости — 5–9 лет после лучевой терапии). В противоположность лейкозам другие ЗН, главным образом солидные опухоли, имеют существенно более длительный период развития. Большинство из этих опухолей появляется спустя не менее 10 лет после облучения, а некоторые из них диагностируются через 15 лет и более. В наиболее масштабном международном когортном исследовании, объединившем данные 13 популяционных канцер-регистров из разных стран, были прослежены в течение 1943–2000 гг. 525 527 женщин с первичным РМЖ. За этот период у них было выявлено 31 399 случаев метастатических первичных ЗН. Показатель риска развития всех опухолей, за исключением контралатерального РМЖ, составил 1,25 (95 % ДИ 1,24–1,26). С действием лучевой терапии авторы предположительно связывают развитие вторых первичных опухолей пищевода, легкого, желудка, риск которых нарастал с длительностью наблюдения. Показательно 6-кратное повышение риска сарком мягких тканей в области грудной клетки и верхних конечностей, т. е. в области, прилегающей к месту облучения первого заболевания. Авторы не приводят собственных данных по показателям появления вторых опухолей в разные календарные периоды, которые могли существенно различаться методическими подходами и использованием лекарственных средств. Вместе с тем согласно некоторым источникам, приводимыми авторами, отмечена тенденция снижения риска развития этих опухолей после 1975 г. у больных с длительностью выживаемости 10 лет и более, что может отражать снижение лучевого воздействия на нормальные ткани при использовании современных методов лучевой терапии [28].

Современная онкология немыслима без использования химиотерапевтических препаратов, повреждающих опухолевые клетки и тормозящих рост опухоли. Наряду с хирургическим лечением, лучевой и/или иммунотерапией химиотерапия является одним из ведущих методов лечения ЗН. Нередко все эти методы используются в сочетании, особенно при лечении солидных опухолей. Именно комплексная терапия является наиболее перспективной [29, 30].

Классические цитостатики в зависимости от их противоопухолевой активности в различные фазы клеточного цикла делят на фазоспецифические, циклоспецифические, действующие в течение всего цикла, и циклонеспецифические, действующие на клетки в фазе покоя (G0). Комбинация этих препаратов позволяет рассчитывать на повреждение большого числа опухолевых клеток, как делящихся, так и находящихся в фазе G0. ЦитокINETический принцип заключается в синхронизации клеточных циклов с помощью одного препарата, губительно действующего на клетки

в митозе. Сохранившиеся клетки вступают в новый клеточный цикл синхронно. Когда они находятся в фазе S, действует специфический для этой фазы препарат. ЦитокINETическим принципом можно объяснить эффективность комбинаций с производными нитрозометилмочевины. Препараты этой группы поражают клетки, находящиеся в фазе G0. Однако этот принцип, весьма привлекательный с точки зрения создания рациональных схем комбинированной химиотерапии, практически невозможно использовать для индивидуализации терапевтического режима у отдельного больного, в первую очередь в связи гетерогенностью клеточного состава опухоли [31].

Все цитостатики обладают высокой биологической активностью, неизбирательной по отношению к опухоли. Одновременно с опухолью их воздействию подвергаются многие нормальные органы и ткани, в первую очередь те, для которых характерна высокая пролиферативная активность (костный мозг, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), волосные фолликулы и др.). Механизм повреждения нормальных тканей сходен с механизмом действия на опухоль и проявляется разнообразными побочными эффектами. Наиболее характерным и присущим большинству цитостатиков побочным эффектом их действия является угнетение гемопоэза, миелосупрессия, токсические явления со стороны ЖКТ. В то же время цитостатики, обладая генотоксическими, мутагенными и канцерогенными свойствами, сами могут представлять канцерогенную опасность. Поэтому особого рассмотрения заслуживают отдаленные и наиболее существенные негативные последствия химиотерапии — ее канцерогенный эффект. Спектр вторых опухолей, развивающихся после химиотерапии, очень широк: это гемобласты и солидные опухоли разных локализаций [15, 32, 33].

Лейкозы, связанные с лечением первых опухолей

Химиотерапия ЗН разных локализаций считается более значимым фактором риска развития вторых лейкозов, чем лучевая терапия. Спустя 1–2 года после лечения алкилирующими агентами риск возникновения лейкозов начинает расти, достигая пика в промежутке 5–10 лет, а затем снижается. Вторые лейкозы плохо поддаются лечению и сопровождаются низким уровнем выживаемости пациентов. Так, медиана выживаемости после развития острого лейкоза пациентов с предшествующей лимфомой Ходжкина (ЛХ) составила только 0,4 года при показателе 5-летней относительной выживаемости 4,9 % (в интервале 0,0–14,2 %). Применение некоторых химиотерапевтических препаратов связано с развитием разных локализаций ЗН, из которых наиболее частыми являются МДС и ОМЛ. Часто вначале развивается МДС, впоследствии переходящий в ОМЛ [34].

Успехи в лечении ЛХ, позволившие существенно (почти до 90 %) повысить 10-летнюю выживаемость

больных, обозначили проблему риска возникновения вторых опухолей у этих пациентов [9]. Среди 404 пациентов с ЛХ, леченных в 1970–2004 гг. и прослеженных до 2009 г. (штат Техас, США), с химиотерапией было связано повышение риска возникновения всех типов вторых солидных опухолей в 1,85 раза (95 % ДИ 1,01–3,11), гемобластозов в 8,74 раза (95 % ДИ 3,21–19,03) [35]. Лейкозы, связанные с химиотерапией ЛХ, возможно, по причине лучшей излечиваемости первичной опухоли, изучались наиболее широко. В нескольких больших аналитических эпидемиологических исследованиях получены близкие результаты, свидетельствующие о том, что МОРР-комбинированная химиотерапия (МОРР = хлорметин + винкристин + прокарбазин + преднизолон) представляет самый высокий риск развития вторичных лейкозов. Оценки относительного риска (ОР) при сравнении с пациентами, получавшими только лучевую терапию, находились в диапазоне от 3,5 до примерно 24. ОР лейкозов нарастал с повышением кумулятивной дозы и с увеличением циклов МОРР [5].

Наблюдение за пациентами с MALT-лимфомой желудка в течение 72 мес показало, что химиотерапия является независимым фактором риска, вызывая развитие вторых солидных опухолей (ОР 2,91; 95 % ДИ 1,60–4,22) и гемобластозов (ОР 5,54; 95 % ДИ 1,70–9,38) [36].

Вторые гемобластозы наиболее часто встречаются при лечении первых: злокачественных лимфом и множественной миеломы, однако они наблюдаются и после лечения солидных опухолей, таких как РМЖ, рак легкого, яичек, яичников и сарком, являя собой острую медицинскую проблему. Так, при РМЖ, который в структуре онкологической заболеваемости женщин находится в числе ведущих локализаций, вторые гемобластозы, обусловленные противоопухолевой терапией, встречаются у 0,3–5,0 % пациенток. В абсолютном выражении их число существенно превышает число женщин со вторыми опухолями при других, менее распространенных ЗН [37].

К алкилирующим агентам, вызывающим лейкоз, относятся бусульфан, кармустин, циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан и др. Риск ОЛЛ растет с повышением дозы препарата и длительности терапии первой опухоли [8]. Темозоломид – алкилирующий агент, применяемый при лечении глиом – также вызывает развитие вторых гемобластозов, особенно ОЛЛ [38].

В прошлом препараты платины не рассматривались как лейкозогенные несмотря на то, что вызываемые ими поражения ДНК аналогичны таковым от действия алкилирующих агентов. Однако, как показали исследования больных раком яичников, наблюдалась корреляция между кумулятивной дозой цисплатина и значимым повышением риска развития лейкоза при учете других терапевтических факторов. В исследовании 28 791 женщины с раком яичника последующий риск заболевания лейкозами составил 4,0 (95 % ДИ 1,4–11,4). При дозе < 500 мг он был равен 1,9. С увели-

чением дозы > 1000 мг риск вырос до 7,6 ($P_{\text{тренд}} < 0,001$). Риск также нарастал с длительностью лечения: у женщин, получавших препараты платины более 12 мес, он составил 7,0 ($P_{\text{тренд}} = 0,001$). По оценкам, среди 10 000 женщин, больных раком яичника, получивших в течение 6 мес кумулятивную дозу этих препаратов от 500 до 1000 мг и более, в последующие 10 лет можно ожидать соответственно от 21 до 71 дополнительных случаев лейкоза [39]. Лечение ингибиторами ДНК-топизомеразы II, особенно этопозидом и тенипозидом, приводит к развитию вторичного ОМЛ. Метаанализ результатов 6 когортных исследований мужчин с герминально-клеточными опухолями, получивших комплексную химиотерапию этопозидом, цисплатином и блеомицином, выявил риск ОМЛ, превышающий популяционный уровень в 40 раз. Раздельное применение этих препаратов не вело к повышению риска ОМЛ, что предполагает усиление канцерогенных свойств этопозидом в присутствии алкилирующих агентов [40]. Существующие данные дают основания предполагать, что антрациклины доксорубин и эпидоксорубин также связаны с этим типом лейкоза. Он имеет более короткий индукционный период: медиана латентного периода составляет всего 2–3 года [41].

Вторые солидные опухоли, связанные с противоопухолевой терапией

Развитие вторых первичных солидных опухолей также может быть связано с лечением ЗН. Преобладающее число исследований в этой области посвящено изучению влияния лучевой терапии или ее комплекса с химиотерапией. Основными локализациями ЗН, развившимися после указанных видов лечения, являются молочная и щитовидная железы. В отличие от вторых лейкозов латентный период развития солидных опухолей, обусловленных терапией первого онкологического заболевания, значительно длиннее – обычно более 10 лет. Несмотря на низкое ОР развития этих опухолей, именно они составляют основную массу вторых ЗН у онкологических пациентов. Второй первичный РМЖ преобладает у женщин с первым диагнозом ЛХ. Риск коррелирует с дозовой нагрузкой, размером поля облучения в области грудной клетки и молодым (30 лет и менее) возрастом на момент терапии [5]. Длительное, в течение почти 40 лет, проследивание датских пациентов выявило, что показатель кумулятивной заболеваемости вторыми солидными опухолями за период 1965–2000 гг. практически не изменился. Медиана проследивания составила 19,1 года, и риск вторых опухолей в когорте пациентов в 4,6 раза (95 % ДИ 4,3–4,9) превышал популяционный уровень. Это свидетельствует о том, что риск развития вторых опухолей при ЛХ по-прежнему остается актуальной проблемой [42].

В исследовании, проведенном методом случай–контроль внутри когорты из 19 046 пациентов с ЛХ при учете таких факторов, как курение и лучевая те-

рапия, ОР второго рака легкого от химиотерапии мехлорэтамином и прокарбазином составил 4,2 (95 % ДИ 2,1–8,8). Риск нарастал с повышением кумулятивной дозы этих препаратов ($p < 0,001$). Статистически значимое повышение риска начало проявляться в диапазоне 1–4 года после лечения. Курение в сочетании с химиотерапией оказывало мультипликативный эффект на риск второго рака легкого: он увеличивался более чем в 20 раз [43].

Применение алкилирующих агентов, таких как циклофосфамид и ингибиторы топоизомеразы II в качестве адъювантной химиотерапии при РМЖ было связано с последующими 2 типами генетически различных лейкозов [44]. С начала 1980-х годов в качестве адъювантной химиотерапии при РМЖ у женщин в постменопаузе при наличии позитивных эстроген-рецепторов широко применяется тамоксифен. Он улучшает выживаемость пациенток и снижает частоту контралатерального РМЖ. Курс лечения рассчитан на длительный срок. Помимо этого, показаниями к его применению являются рак почки и саркомы мягких тканей [30]. В рамках программы SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results, USA) начиная с 1980 г. были прослежены 87 323 женщины с диагнозом РМЖ для определения последующего риска развития вторых опухолей. Спустя 5 лет и более с момента постановки первого диагноза РМЖ среди женщин, леченных тамоксифеном, выявлено статистически значимое повышение общего онкологического риска в 1,32 раза и риска развития рака тела матки в 3,59 раза [45]. Дальнейшее наблюдение в рамках указанной программы женщин с диагнозом РМЖ, поставленном в 1980–2000 гг., выявило риск рака тела матки, равный 2,17 (95 % ДИ 1,95–2,41), в сравнении со всеми женщинами, входящими в программу SEER. В 4,62 раза (95 % ДИ 3,20–6,46) оказался повышен и риск смешанных ЗН в области мюллерового протока — редких, но агрессивных опухолей с плохим прогнозом [46]. В целом химиотерапия тамоксифеном ассоциируется с 2–3-кратным повышением риска рака эндометрия, что эквивалентно приблизительно 80 дополнительным случаям на 10 000 женщин спустя 10 лет после лечения РМЖ [47].

Вторые опухоли у детей, перенесших противоопухолевую терапию

Значительные успехи, достигнутые в детской онкологии за последние 30 лет, существенно увеличили продолжительность жизни детей с ЗН. Пятилетняя выживаемость детей — онкологических больных составляет в России 36 %. Гемобласты лидируют в структуре онкологической заболеваемости детей: на их долю приходится 46,5 % всех ЗН [48], и именно в их лечении достигнуты наибольшие успехи. При ОЛЛ с благоприятным прогнозом на фоне стандартного лечения 5-летняя выживаемость составляет 85 %. Даже при неблагоприятном прогнозе долгосрочная выживаемость после

высокодозной химиотерапии превышает 70 %. При ОМЛ 5-летняя выживаемость составляет около 50 % [29].

Изучение вторых первичных опухолей у детей, перенесших противоопухолевую терапию, представляет особый интерес, так как экспозиция детей к вредным факторам окружающей среды и образу жизни меньше, чем у взрослых. В то же время дети с ЗН получали интенсивную лучевую и химиотерапию в период, когда их органы находились еще на стадии развития, т. е. были наиболее уязвимы. Высокая выживаемость детей, обеспечивая более длительный период наблюдения, предоставляет больше возможностей для изучения механизмов канцерогенеза вторых опухолей в результате действия противоопухолевой терапии. При этом она же определяет необходимость разработки мер по улучшению качества их жизни и профилактики вторых опухолей [49].

В США была прослежена когорта из 14 363 пациентов моложе 21 года на момент диагноза первого ЗН с выживаемостью не менее 5 лет. Начало исследования — 1 января 1976 г. К январю 2006 г. в нем было зарегистрировано 802 случая вторых ЗН (исключая немеланомный рак кожи) у 730 членов когорты. РМЖ и рак ЖКТ были наиболее распространенными вторыми опухолями после перенесенной в детстве ЛХ. Щитовидная железа также была частой локализацией второго рака при первых лейкозах и ЛХ. Саркомы, как вторые опухоли, доминировали у выживших с первичной саркомой мягких тканей и ЛХ, гемобласты — у первичных больных с ЛХ и лейкозами, опухоли центральной нервной системы (ЦНС) — после первичного диагноза этой же локализации и лейкозов. Общая онкологическая 20-летняя кумулятивная заболеваемость составила 3,2 %, 30-летняя — 9,3 %. На январь 2000 г. стандартизованное ОР по сравнению с населением составило 6,4. Более высокий общий онкологический риск наблюдали у выживших пациентов женского пола: 1,64 по сравнению с пациентами мужского пола. Дети младшего возраста на момент диагноза имели более высокий риск всех вторых ЗН, вместе взятых, а также повышенный риск рака щитовидной железы и ЦНС. Экспозиция к высоким дозам алкилирующих агентов, антрациклинов, эпиподофиллотоксинов также была связана с повышенным риском появления всех изученных локализаций второго первичного ЗН [50].

В НИИ детской онкологии и гематологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина с 1977 по 2008 г. прошли лечение 13 392 ребенка с первичными ЗН. Пятилетняя выживаемость составила 56,5 % (6 950 детей). У 86 (1,2 %) из них в разные сроки (от 9 до 216 мес, в среднем через 8,5 года) возникли вторые опухоли. Частота их возникновения при расчете на всех пролеченных детей почти в 2 раза превышала популяционный уровень заболеваемости первичными ЗН, а при расчете на пациентов с 5-летней выживаемостью — более чем в 3 раза. В группе больных со вторыми опухолями среди первых ЗН преобладали солидные опухоли, составляя 52 %, гемоблас-

тозы – 48 %. Представляется целесообразным привести данные этого пока единственного в нашей стране исследования рассматриваемой актуальной проблемы (табл. 1). Среди вторых опухолей лидировал рак щитовидной железы (30,2 %), на 2-м месте были гемобласты (23,2 %), на 3-м – РМЖ и саркомы (по 10,4 %) и далее опухоли ЦНС (5,8 %), 20 % составляли единичные случаи опухолей других локализаций. Соотношение заболевших вторыми опухолями девочек и мальчиков составило 1,45:1,00.

Только 5,8 % вторых опухолей могли быть отнесены к генетически детерминированным: у 5 больных, в детстве излеченных от билатеральной ретинобластомы, выявлена герминальная мутация гена *Rb1*. Ведущим фактором риска развития РМЖ явилась лучевая терапия на область грудной клетки по поводу первой опухоли в детстве при лечении ЛХ, НХЛ, сарком и нефробластомы. Наряду с лучевой терапией, затрагивающей область молочной и щитовидной желез, у пациентов, излеченных в детстве от НХЛ, в число факторов риска вторых опухолей входит терапия цитарабином и высокими дозами антрациклиновых противоопухолевых препаратов [14].

Зарубежные и отечественные данные свидетельствуют о том, что лучевая терапия – ведущий фактор риска развития вторых опухолей у детей с первыми опухолями, особенно ЛХ. Риск возникновения РМЖ и рака щитовидной железы сопряжен с зоной облучения в области грудной клетки и дозой облучения [51]. В число факторов риска, помимо лучевой терапии, входят более ранний возраст на момент диагноза первого ЗН, наследственная предрасположенность, женский пол, противоопухолевая терапия алкилирующими агентами, антрациклинами и ингибиторами топоизомеразы II, тип первой опухоли (ЛХ, ОЛЛ, опухоли головного мозга, костей). Риск нарастает с длительностью прослеживания. Наиболее частые опухоли: РМЖ, опухоли костей, рак щитовидной железы, МДС/ОМЛ [52].

Вторые опухоли, возникшие после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

С середины прошлого века в медицинскую практику вошла, а с конца 20-го столетия получила широкое распространение трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – введение гемопоэтических стволовых клеток донора реципиенту в целях частичного или полного замещения кроветворения после назначения цитостатических препаратов и/или лучевой терапии, обеспечивающих иммунологическую толерантность и приживление стволовых клеток. Этот метод стал рутинным, он включен во множество современных протоколов лечения онкологических заболеваний, а также аутоиммунных и врожденных метаболических нарушений. Различают аллогенную трансплантацию (алло-ТГСК) – замену собственных кроветворных клеток донорскими – и аутологичную (ауто-ТГСК), когда донором является сам реципиент. Алло-ТГСК широко

Таблица 1. Вторые опухоли у пациентов с первыми опухолями в детстве (адаптировано из [14])

Первые опухоли	Вторые опухоли
Солидные опухоли (n = 45)	Гемобластоз (n = 13) Саркома (n = 8) Рак щитовидной железы (n = 7) Рак молочной железы (n = 6) Нефробластома (n = 2) Нейробластома (n = 2) Другие (n = 7)
Гемобласты (n = 41)	Рак щитовидной железы (n = 19) Гемобластоз (n = 7) Опухоли центральной нервной системы (n = 5) Рак молочной железы (n = 3) Другие (n = 7)

применяется в терапии острых лейкозов и МДС [53, 54]. О масштабах использования этого метода лечения говорит тот факт, что в мире к 2012 г. число больных, в отношении которых он был применен, превысило 1 млн. Только в Европе в 2013 г. терапию алло-ТГСК по поводу ЗН получил 32 691 больной. Из них 11 190 – пациенты с лейкозами, 19 958 – с лимфопролиферативными заболеваниями и 1543 – с солидными опухолями. К сожалению, в России по ряду причин (отсутствие банка донорского материала, высокая стоимость лечения и др.) этот метод не получил повсеместного распространения. Динамика его использования с 1998 по 2013 г. практически не изменилась: число алло-ТГСК за этот период находилось в диапазоне 1–50, а ауто-ТГСК – 1–100 на 10 млн населения в год. Для сравнения, в большинстве стран западной Европы диапазон составляет 201–300 и 301–400, а в ФРГ – более 300 и 400 на 10 млн соответственно [55]. С ТГСК связывают существенное повышение выживаемости онкологических больных [56].

Важной проблемой после высокодозной химиотерапии и ауто-ТГСК при лечении ЛХ и НХЛ стало развитие последующих связанных с ними т-МДС/ОМЛ. Не во всех исследованиях выявлен повышенный риск вторых опухолей, связанный с этим методом. Так, в Британской Колумбии (Канада) в течение 1976–2001 гг. была прослежена когорта из 1732 больных ЛХ. Кумулятивная онкологическая заболеваемость в когорте спустя 15 лет после лечения ЛХ составила 9 % (ОР 3,5; $p < 0,001$) при отсутствии различий между группами пациентов, получивших обычную химиотерапию, и тех, у кого она сопровождалась ауто-ТГСК по крайней мере в первые 10 лет после лечения. При обоих методах значимыми факторами риска были только возраст пациентов 35 лет и более ($p = 0,03$) и стадия заболевания III/IV [57]. Однако чаще риск т-МДС/ОМЛ был выше при ауто-ТГСК по сравнению со стандартной химиотерапией при существенной его вариабельности в разных исследованиях. Наиболее важными факторами риска явились предшествующие ауто-ТГСК высокие

кумулятивные дозы алкилирующих агентов, а также подготовительная тотальная лучевая терапия. Латентный период развития т-МДС/ОМЛ после ауто-ТГСК короткий: 12 мес и менее у 27 % пациентов [58]. Риск вторых т-МДС/ОМЛ при 4 и более режимах предварительной химиотерапии повышается в 5,38 раза (95 % ДИ 1,75–16,58) по сравнению с меньшим их числом [59].

Одним из наиболее серьезных осложнений, возникающих в первые 100 дней после алло-ТГСК, является острая и хроническая реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). В отличие от ауто-ТГСК применение алло-ТГСК не связано с существенным повышением риска вторых т-МДС/ОМЛ, низкая заболеваемость которыми, возможно, объясняется факторами, предшествующими трансплантации, а не самой алло-ТГСК как таковой. Вместе с тем факторы, вовлеченные в алло-ТГСК, могут стимулировать развитие широкого спектра лимфопролиферативных заболеваний: от доброкачественных поликлональных гиперплазий до злокачественных моноклональных лимфом [60]. Как ауто-ТГСК, так алло-ТГСК представляют опасность развития вторых солидных опухолей. Самые высокие риски (от 1,85 до 34,0), выявленные в больших эпидемиологических исследованиях, проявляются в отношении вторых опухолей кожи, ротовой полости, щитовидной железы, головного мозга и ЦНС, соединительной ткани и костей. Латентный период возникновения этих опухолей

растягивается на многие годы, не достигая плато со временем. В развитие вторых ЗН при алло-ТГСК могут быть вовлечены многие факторы: лучевая и химиотерапия, иммуносупрессивная терапия при РТПХ, иммунная и антигенная стимуляция, активность онкогенных вирусов (вирус гепатита С, папилломы человека, Эпштейна–Барр), генетическая предрасположенность [61, 62].

Оценка канцерогенности химиотерапевтических препаратов Международного агентства по изучению рака

Эксперты МАИР отнесли к доказанным канцерогенам для человека (группа 1) большую группу химиопрепаратов на основании генотоксического механизма их действия и результатов эпидемиологических исследований. Материалы представлены в нескольких монографиях МАИР: том 50 (1990 г.), 76 (2000 г.) и 100А (2012 г.). В октябре 2008 г. группа в составе 21 эксперта из 9 стран еще раз рассмотрела данные о канцерогенности ряда лекарственных препаратов и отнесла их к доказанным канцерогенам для человека. Выводы, касающиеся противоопухолевых препаратов, представлены в табл. 2.

К доказанным канцерогенам для человека отнесен тамоксифен, повышающий риск возникновения рака эндометрия путем стимулирования пролиферации в эндометриальном эпителии при взаимодействии

Таблица 2. Канцерогенные противоопухолевые препараты (адаптировано из [63])

Доказанные канцерогены для человека (группа 1)	Злокачественные новообразования, повышенный риск возникновения которых доказан	Установленный механизм действия
Бусульфан (милеран)	Острый миелоидный лейкоз	Генотоксичность (алкилирующий агент)
Хлорамбуцил	Острый миелоидный лейкоз	Генотоксичность (алкилирующий агент)
Циклофосфамид	Острый миелоидный лейкоз Рак мочевого пузыря	Генотоксичность (алкилирующий агент)
Мелфалан	Острый миелоидный лейкоз	Генотоксичность (алкилирующий агент)
Семустин (метил-CCNU)	Острый миелоидный лейкоз	Генотоксичность (алкилирующий агент)
Тиофосфамид (тиотеф)	Лейкоз	Генотоксичность (алкилирующий агент)
Треосульфан	Острый миелоидный лейкоз	Генотоксичность (алкилирующий агент)
МОРР-комбинированная химиотерапия (винкристин, прокарбазин, преднизолон)	Острый миелоидный лейкоз Рак легкого	Генотоксичность
Этопозид в комбинации с цисплатином и блеомицином	Острый миелоидный лейкоз	Генотоксичность, транслокации с вовлечением <i>MLL</i> -гена (этопозид)
Хлорнафазин	Рак мочевого пузыря	Генотоксичность (алкилирующий агент, метаболизм до дериватов 2-нафтиламина)
Азатиоприн	Неходжкинская лимфома Рак кожи	Генотоксичность, иммуносупрессия
Циклоспорин	Неходжкинская лимфома Рак кожи Другие многочисленные локализации	Иммуносупрессия
Метоксален в сочетании с ультрафиолетовым облучением	Рак кожи	Генотоксичность после фотоактивации

с эстрогеновыми рецепторами [44]. Исходя из имеющихся данных, экспертами МАИР ряд цитостатиков был отнесен в группу 2А — вероятных канцерогенов для человека: адриамицин, бисхлорэтилнитрозомочевина (BCNU) [64]. Учитывая имеющиеся данные и оценку МАИР, препараты, отнесенные в группы 1 и 2А, включены в отечественный нормативный документ — Сан-ПиН 1.2.2353–08 «Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности».

Создание новых противоопухолевых средств направлено на получение таких препаратов, которые при максимальном ингибирующем воздействии на опухолевые клетки минимально повреждали бы нормальные клетки и ткани организма.

Таргетные противоопухолевые препараты

Многие годы исследований, посвященные изучению генетических, биохимических и молекулярных различий между раковыми и нормальными клетками, привели к реальному успеху в онкологии — созданию новых противоопухолевых препаратов, действующих на эпигенетическом уровне. Основой этому послужили молекулярно-генетические исследования последних десятилетий, которые выявили особенность опухолевых клеток. Выяснилось, что они отличаются от нормальных более выраженным полиморфизмом многих внутриклеточных белков, выполняющих регуляторные функции, обеспечивая важные сигнальные пути. Это обусловлено активацией онкогенов и высокой нестабильностью генома опухолевой клетки, что ведет к появлению разнообразных мутаций в генах, кодирующих эти белки и, как следствие, к появлению в опухолевых клетках мутантных белков, не экспрессируемых в нормальных клетках (онкобелков). Помимо этого, во многих опухолях обнаружена гиперэкспрессия целого ряда нормальных белков, что характерно для опухолевого фенотипа. Теоретически воздействие на такие белки (ингибирование их активности или инактивирование) должно вести к гибели опухолевых клеток или к ингибированию их размножения. При этом на нормальные клетки подобные воздействия влиять не должны. Таким образом, появляется возможность целенаправленно воздействовать на специфические молекулярные мишени в опухолевых клетках. Эти положения получили воплощение в противоопухолевой химиотерапии с образованием нового класса цитостатиков, так называемых таргетных, молекулярно ориентированных препаратов (target — мишень). К ним относят препараты, создаваемые для воздействия на определенные, заранее установленные внутриклеточные молекулярные мишени, имеющие ключевое значение для жизнедеятельности опухолевой клетки. Как уже упоминалось, все эти мишени имеются и в нормальной клетке, но при опухолевой трансформации может происходить их гиперэкспрессия или гиперактивация, что и является основанием для применения определенных тар-

гетных препаратов для лечения онкологических больных [65].

Виды таргетной терапии различаются по механизму действия, но все они без существенного повреждения нормальных клеток так или иначе вмешиваются в способность трансформированных клеток к росту, делению, репарации и/или ее коммуникации с другими клетками. Таргетная терапия использует малые молекулы (низкомолекулярные соединения), способные проникать в клетку, нарушать ее функции, в конечном итоге приводя к ее гибели.

В процессе канцерогенеза нарушается нормальная регуляция путей передачи сигналов системы, и клетка претерпевает злокачественную трансформацию. Принцип действия таргетной терапии, влияющей на сигнальные пути, основан на том, что в норме лиганды (молекулы гормонов, цитокинов, факторов роста и др.) взаимодействуют с рецепторами клетки, а те передают сигнал через сеть молекул, преимущественно белковых киназ, к ядру, что определяет способность клетки к пролиферации, дифференцировке, апоптозу, адгезии, ангиогенезу. На принципе блокирования сигнальных путей основано действие препаратов, применяемых в противоопухолевой терапии широкого спектра ЗН, имеющих мишенью рецепторы факторов роста, в первую очередь эпидермального фактора роста (EGFR) и 4 членов его семейства — EGFR1, EGFR2, EGFR 3, EGFR4 [31].

Другой вид препаратов (моноклональные антитела) нацелен на рецепторы, находящиеся вне клетки. В норме организм продуцирует антитела в ответ на поступление антигена (инородного белка), к которому они пристраиваются, маркируя его для уничтожения иммунной системой организма. Анализ специфических антигенов на поверхности раковой клетки направлен на определение белка, способного выступать как антиген. Затем, используя белок животных или человека, создается специфическое антитело, способное пристраиваться к целевому белку на поверхности клетки. Терапия моноклональными антителами применима для тех видов опухолей, для которых идентифицированы антигены и, соответственно, созданы антитела.

В процессе ангиогенеза эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды, делятся и растут, создавая новые кровеносные сосуды. Наиболее активно они формируются в период эмбрионального развития организма, во время роста и репарации тканей и при опухолевом росте. Ингибиторы неоангиогенеза подавляют образование новых сосудов, питающих опухоль, и вызывают таким образом истощение и гибель клеток.

Еще один тип препаратов нацелен на естественные системы и процессы в организме, способные повысить эффективность противоопухолевой терапии. Он тесно связан с иммунотерапией и иммунной системой организма в целом [65].

С учетом механизмов действия таргетных препаратов их применение оправданно лишь для лечения опухолей, содержащих конкретные мишени для воз-

действия этих препаратов. Вместе с тем их номенклатура постоянно расширяется. Так, в «Руководстве по химиотерапии опухолевых заболеваний» 2011 г. приведены 17 препаратов, получивших практическое применение и используемых как в онкогематологии, так и при лечении солидных опухолей [31]. В следующем его издании указаны уже 24 препарата, зарегистрированные в России на март 2014 г., и 3 находящиеся в процессе регистрации [30]. Несомненно, это постоянный процесс, так как с разработкой новых препаратов появляются новые возможности лечения больных даже на поздних стадиях онкологического заболевания. При этом реально увеличиваются продолжительность и качество жизни онкологических больных [66, 67].

Механизмы действия классических химиопрепаратов — алкилирующих агентов и таргетных препаратов — принципиально различны. У первых в основе действия лежит генотоксичность, вторые действуют на эпигенетическом уровне. Несмотря на высокую селективность таргетных препаратов, при их использовании могут появиться ранее неизвестные и непредсказуемые побочные эффекты. К числу зарегистрированных такого рода эффектов относятся дерматологические реакции (нарушение структуры ногтей, угревая сыпь, шелушение, зуд и др.). Для многих таргетных препаратов в значительной степени выражена токсичность по отношению к функционированию ЖКТ (тошнота, рвота, анорексия, диарея). Кардиотоксичность сравнительно редко развивается при монотерапии некоторыми таргетными препаратами, но значительно усиливается при сочетании их с классическими цитостатиками. [30, 68].

Таргетная терапия имеет ряд ограничений. Главное из них — вероятность развития устойчивости к действию таргетных препаратов. Например, у некоторых пациентов развивается устойчивость к иматинибу, в основе которой лежит мутация гена *BCR-ABL*, приводящая к изменению белка таким образом, что он не может более образовывать связь с препаратом. В большинстве случаев другие таргетные препараты не способны преодолеть эту устойчивость [69].

В настоящее время таргетные препараты применяются в виде монотерапии, главным образом на первых стадиях онкологического заболевания, но чаще они входят в комплексную терапию ЗН наряду с классическими противоопухолевыми препаратами. В связи с этим отделить их отсроченный нежелательный эффект от действия других цитостатиков практически невозможно. Пока нет достаточных доказательств влияния таргетных препаратов, основанных на масштабных эпидемиологических исследованиях, на риск развития вторых опухолей. По-видимому, это станет возможным по мере развития данного направления противоопухолевой терапии. Пока же единственным способом оценки риска развития вторых опухолей остаются экспериментальные исследования.

Профилактика возникновения вторых опухолей

При лечении первых опухолей вопрос выживаемости, несомненно, превалирует над возможной перспективой отдаленных последствий в виде вторых опухолей. Несмотря на то, что химиотерапия повышает риск их развития, ее эффект значительно перекрывает побочные действия, о чем свидетельствует повышение выживаемости онкологических больных. Эпидемиологическими исследованиями убедительно показано, что наряду с противоопухолевой терапией факторами риска развития вторых опухолей являются те же факторы, которые значимы и в этиологии первых опухолей:

- образ жизни (курение, алкоголь, питание и др.);
- загрязнение окружающей среды, а также канцерогенные профессиональные воздействия, вирусы гепатита С, Эпштейна—Барр, папилломы человека, ультрафиолетовое излучение и др.;
- факторы хозяина (возраст и пол, генетическая предрасположенность, состояние иммунной системы, гормональный фон и др.);
- взаимодействие между указанными факторами.

Парадигма профилактики вторых опухолей содержит в своей основе те же рекомендации, действенность которых доказана в отношении первых опухолей. По существу, многие из перечисленных факторов являются управляемыми. Меры по минимизации их воздействия детально разработаны для применения на популяционном и индивидуальном уровнях [70, 71]. Если контроль качества окружающей и производственной среды входит в обязанности государства и соответствующих контролирующих органов [72], то образ жизни человека, поведенческие установки, во многом определяющие уровень индивидуального онкологического риска, являются сферой его персональной ответственности. Специалисты Европейского регионального бюро Всемирной организации здравоохранения разработали «Европейский кодекс против рака» — рекомендации по профилактике рака для широких масс населения. В Кодексе перечислены 12 рекомендаций, призванных помочь людям вести здоровый образ жизни и активно способствовать профилактике рака. По расчетным данным, их соблюдение могло бы предотвратить почти половину смертей от ЗН в Европе [73, 74]. Несомненно, данные рекомендации особенно актуальны для лиц, прошедших терапию по поводу онкологического заболевания. Как показано выше, они относятся к группе, в которой риск развития последующего рака существенно выше, чем в общей популяции в силу имевшего место воздействия противоопухолевой терапии, обладающей, помимо лечебного эффекта, канцерогенным потенциалом. Эти люди должны не только строго придерживаться здорового образа жизни, но и пунктуально следовать общим рекомендациям по скринингу ЗН, разработанным для выявления на ранних стадиях опухолей различных локализаций. Особенно это касается пациентов с установленной наследственной предрасположенностью к развитию ЗН, поскольку у них высок

риск ее реализации вследствие активного взаимодействия этиологических факторов различной природы, включая противоопухолевую терапию. Женщины с отягощенной наследственностью в отношении РМЖ, наличием мутаций (*BRCA1* и *BRCA2*), перенесшие лучевую терапию, затрагивающую область грудной клетки, должны ежегодно проходить магнитно-резонансную томографию в дополнение к маммографии. Пока применение тамоксифена для женщин с *HER+* остается эффективным средством снижения контралатерального второго РМЖ, и нет данных о препаратах, способных снизить этот риск у женщин с отрицательным статусом в отношении эстроген-рецепторов [75].

Повышенный риск возникновения рака яичника имеют женщины, леченные по поводу РМЖ – носители мутаций *BRCA1* и *BRCA2*, с диагностированным синдромом Линча и наличием рака яичника в семейном анамнезе. Больных ЗН репродуктивной системы и/или толстой кишки следует относить к группе риска вторых опухолей тех же локализаций и ориентировать на длительное и регулярное определение комплекса опухолевых маркеров (CA 125, CA 19.9, раковый эмбриональный антиген), даже если эти показатели были ниже дискретного уровня до начала лечения [22]. Женщины с повышенным риском развития второго рака яичника и тела матки должны проходить регулярное ультразвуковое исследование органов малого таза каждые 2–6 мес [76]. Риск развития второго рака толстой кишки наиболее высок среди лиц, в семейном анамнезе которых есть случаи этого заболевания, и/или лиц с синдромом Линча. Для них эффективным методом скрининга является колоноскопия с удалением имеющихся полипов и дальнейшим наблюдением. Таким образом, для каждой локализации существуют разработанные и апробированные в широких масштабах специфические методы скрининга: для рака легкого, предстательной железы, меланомы и др., обязательные для применения в группе лиц, леченных по поводу первого ЗН, особенно среди лиц с наследственной онкологической отягощенностью.

Неотъемлемой частью первичной и вторичной профилактики рака, во многом определяющей ее эффективность, является информационная составляющая. Пациенты должны быть информированы о существующих рисках, особенно тех, которые они могут минимизировать при ответственном отношении к собственному здоровью. Предоставлять такую информацию могут онкологи и другие медицинские работники, для которых онкологические больные должны быть объектом особого внимания. К сожалению, сами медицинские работники не всегда достаточно информированы об отдаленных последствиях противоопухолевой терапии. Как показал опрос 1130 онкологов и 1072 медицинских работников первичного звена, проведенный сотрудниками Гарвардской медицинской школы (США), о риске вторых ЗН после химиотерапии РМЖ и рака толстой кишки, знали 62 % опрошенных онкологов и 17 % работников первичного звена. При растущем контингенте

выживших онкологических больных явно необходима полная информированность медицинских работников в области профилактики вторых опухолей [77].

Конкретных рекомендаций, исходящих из имеющихся эпидемиологических данных и касающихся тактики лечения первых опухолей применительно к профилактике риска развития вторых опухолей, в литературе не приводится. Понятно, что тактика определяется клинической картиной и апробированными схемами лечения, поэтому растет интерес исследователей, клиницистов к разработке статистических моделей для прогноза онкологического риска. Количество и качество информации определяют адекватность модели, позволяющей стратифицировать пациентов для последующего наблюдения и проведения медицинских мероприятий, соответствующих степени риска [78]. Растущая продолжительность жизни онкологических больных делает необходимым длительное прослеживание выживших лиц с первыми опухолями для оценки отдаленных последствий в зависимости от методов лечения. Актуальной остается изучение взаимодействия противоопухолевой терапии с приведенными выше средовыми, поведенческими, генетическими факторами риска и их влияния на показатели выживаемости и риск развития вторых опухолей. Помимо этого, когорты онкологических пациентов с детальной терапевтической информацией могли бы дать новые сведения, касающиеся широкого круга отдаленных неблагоприятных последствий, включая сердечно-сосудистые заболевания, неврологические и эндокринные нарушения, значимые в качестве жизни пациентов и ее продолжительности. В проспективных исследованиях не менее важным представляется сбор биологических образцов для лучшего понимания влияния генетических факторов на риск развития вторых опухолей и других последствий. О насущной необходимости корректных проспективных исследований говорит тот факт, что Национальный институт онкологии США спонсировал симпозиум «Использование данных когортных исследований онкологических пациентов: понимание современного состояния знаний и разработка будущих исследовательских приоритетов», состоявшийся в ноябре 2011 г. в Вашингтоне. На симпозиуме, объединившем клиницистов, эпидемиологов, биологов, биостатистиков, были разработаны детальные рекомендации, применимые для разных типов исследований и касающиеся сбора, унификации, гармонизации и передачи информации, взаимодействия различных структур, причастных к изучаемой проблеме [79]. Таким образом, совокупность описанных факторов делает все более очевидной необходимость кооперации специалистов разного профиля с использованием клинических, эпидемиологических, молекулярных подходов для изучения механизмов канцерогенеза первых и вторых опухолей, выбора эффективных, но наиболее щадящих методов противоопухолевой терапии для снижения риска ее отдаленных последствий и их профилактики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. Под ред. М. И. Давыдова, Е. М. Аксель. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН 2010;21(2;80). Прил. 1. С. 12. [Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2008. Eds. by: M. I. Davydov, E. M. Axel'. Vestnik RONTs im. N. N. Blokhina RAMN = Herald of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS 2010;21(2;80). Ex. 1. P. 12. (In Russ.)].
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М., 2016. 236 с. [Status of the oncologic assistance to the population of Russia in 2015. Eds. by A. D. Kaprin, V. V. Starinskiy, G. V. Petrova. Moscow, 2016. 236 p. (In Russ.)].
3. Verdecchia A., Guzzinati S., Francisci S. et al. EUROCORE Working Group: Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. Eur J Cancer 2009;45:1042–66.
4. De Angelis R., Sant M., Coleman M. P. et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCORE – 5-a population-based study. Lancet Oncol 2014;15(1):23–34.
5. Travis L. B. Epidemiology of second primary cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(11):2020–6.
6. Трапезников Н. Н., Аксель Е. М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ (Состояние онкологической помощи, заболеваемость и смертность). М., 2001. С. 282. [Trapeznikov N. N., Aksel' E. M. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries (Status of oncologic assistance, morbidity and fatality). Moscow, 2001. P. 282. (In Russ.)].
7. Boice J. D. Jr, Curtis R. E., Kleinerman R. A. et al. Multiple primary cancers in Connecticut, 1935–1982. Yale J Biol Med 1986;59(5):533–45.
8. Ng A. K., Bernardo M. V. P., Weller E. et al. Second malignancies after Hodgkin disease treated with radiation therapy with or without chemotherapy: long-term risks and risk factors. Blood 2002;100:1989–96.
9. Ильин Н. В., Виноградова Ю. Н. Поздние осложнения больных лимфомой Ходжкина. Практическая онкология 2007;8(2):96–101. [Il'in N. V., Vinogradova Yu. N. Late complications of the Hodgkin's lymphoma. Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology 2007;8(2):96–101. (In Russ.)].
10. Ng A. K., Travis L. B. Subsequent malignant neoplasms in cancer survivors. Cancer J 2008;14(6):429–34.
11. Soerjomataram I., Coebergh J. W. Epidemiology of multiple primary cancers. Methods Mol Biol 2009;471:85–105.
12. Шунько Е. Л. Лучевая и химиотерапия как факторы развития первично-множественных злокачественных новообразований (Обзор литературы). Современные проблемы науки и образования 2011;6. Доступно по: <http://www.science-educatin.ru/article/view?id=5269>. [Shun'ko E. L. Radial and chemical therapy as factors of development of multiple primary neoplasms (Literature review). Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education 2011;6. Available at: <http://www.science-educatin.ru/article/view?id=5269>. (In Russ.)].
13. Ханов А. М. Современные представления о первично-множественных опухолях. Классификации. Доступно по: <http://travelexpress.lt/obschaja-onkologija/pervichno-mnozhestiennyje-opuholi.html>. [Khanov A. M. Modern perceptions of multiple primary neoplasms. Classifications. Available at: <http://travelexpress.lt/obschaja-onkologija/pervichno-mnozhestiennyje-opuholi.html>. (In Russ.)].
14. Заева Г. Е., Михайлова С. Н. Вторые опухоли у детей, излеченных от злокачественных новообразований. Детская онкология. Национальное руководство. Под ред. М. Д. Алиева, В. Г. Полякова, Г. Л. Менткевича, С. А. Маяковой. М., 2012. С. 640–649. [Zaeva G. E., Mikhaylova S. N. Repeated tumors at children, cured from malignant tumors. Children's oncology. National guidelines. Eds. by: M. D. Aliev, V. G. Polyakov, G. L. Mentkevich, S. A. Mayakova. Moscow, 2012. Pp. 640–649. (In Russ.)].
15. Marcheselli R., Marcheselli L., Cortesi L. et al. Risk of second malignancy in breast cancer survivors: a nested population-based case-control study. J Breast Cancer 2015;18(4):374–85.
16. Multiple primary cancers in Connecticut and Denmark. Eds by: J. D. Jr Boice, N. H. Storm, R. E. Curtis et al. Natl Cancer Inst Monogr 1985;68:1–437.
17. Krueger H., McLean D., Williams D. The prevention of second primary cancers. Prog Exp Tumor Res. Basel; New York; Karger, 2008. 147 p.
18. IARC International rules for multiple primary cancers. Working group. Lyon: IARC, 2004. Eur J Canc Prev 2005;14(4):307–8.
19. Molina-Montes E., Requena M., Sanchez-Cantalejo E. et al. Risk of second cancer after a first primary breast cancer: A systematic review and meta-analysis. Gyn Oncol 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gyno.2014.10.029>.
20. Hemminki K., Boffetta P. Multiple primary cancers as clues to environmental and heritable causes of cancer and mechanisms of carcinogenesis. IARC scientific publications 2004;157:289–97.
21. Сельчук В. Ю. Первично-множественные злокачественные опухоли (клиника, лечение и закономерности развития). Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1994. 70 с. [Sel'chuk V. Yu. Multiple primary neoplasms (clinic, treatment and laws of development). Author's abstract of thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 1994. 70 p. (In Russ.)].
22. Кашурников А. Ю. Первично-множественные злокачественные новообразования органов репродуктивной системы толстой кишки у женщин: закономерности развития, диагностика и прогноз. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2015. 25 с. [Kashurnikov A. Yu. Multiple primary neoplasms of the large bowel of the reproductive system at women: laws of development, diagnosis and forecast. Author's abstract of thesis ... of candidate medical sciences. Moscow, 2015. 25 p. (In Russ.)].
23. Soto A. M., Sonnenschein C. The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. Bioessays 2011;33(5):332–40.
24. Бабаян А. Ю., Залетаев Д. В., Немцова М. В. Подтверждение значения теории полей канцеризации в генезе поверхностного рака мочевого пузыря. Молекулярная медицина 2013;1:24–8. [Babayan A. Yu., Zaletaev D. V., Nemtsova M. V. Confirmation of the value of the cancerization fields' theory in the genesis of the superficial bladder cancer. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine 2013;1:24–8. (In Russ.)].
25. Ford M. B., Sigurdson A. J., Petrusis E. S. et al. Effects of smoking and radiotherapy on lung carcinoma in breast carcinoma survivors. Cancer 2003;98(7):1457–64.
26. Druesne-Pecollo N., Touvier M., Barrandon E. et al. Excess body weight and second primary cancer risk after breast cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Breast Cancer Res Treat 2012;135(3):647–54.
27. Morton L. M., Swerdlow A. J., Schaapveld M. et al. Current knowledge and future research directions in treatment-related second primary malignancies. EJC Suppl 2014;12(1):5–17.
28. Møller M., Friis S., Olsen J. H. et al. Risk of second cancer among women with breast cancer. Int J Cancer 2006;118(9):2285–92.
29. Онкология. Под ред. Д. Касчиато. М.: Практика, 2008. 1039 с. [Oncology. Ed. by D. Caschiato. Moscow: Praktika, 2008. 1039 p. (In Russ.)].
30. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н. И. Переводчиковой, В. А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015. 686 с. [Guidelines on the chemical therapy of malignant diseases. Eds. by:

- N.I. Perevodchikova, V.A. Gorbunova. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2015. 686 p. (In Russ.).
31. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2011. 511 с. [Guidelines on the chemical therapy of tumor diseases. Ed. by N.I. Perevodchikova. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2011. 511 p. (In Russ.).]
 32. Tsai H.J., Wu C.C., Tsai C.R. et al. Second cancers in patients with neuroendocrine tumors. *PLoS One* 2013;8(12):e86414.
 33. Lee D.H., Roh J.L., Baek S. et al. Second cancer incidence, risk factors, and specific mortality in head and neck squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol* 2014;49(5):843–52.
 34. New malignancies among cancer survivors: SEER cancer registries, 1973–2000. Eds. by: R.E. Curtis, D.M. Freedman, E. Ron et al. National Cancer Institute. NIH Publ. No 05–5302. Bethesda, MD, 2006.
 35. Omer B., Kadan-Lottick N.S., Roberta K.B. et al. Patterns of subsequent malignancies after Hodgkin lymphoma in children and adults. *Br J Haematol* 2012;158:615–25.
 36. Tajika M., Matsuo K., Ito H. et al. Risk of second malignancies in patients with gastric marginal zone lymphomas of mucosa associate lymphoid tissue (MALT). *J Gastroenterol* 2014;49(5):843–52.
 37. Haase D., Hanf V., Schulz T. Therapy-related hematologic neoplasias after breast cancer. Epidemiologic, etiologic and cytogenetic aspects and new risk factors according to published data and own results. *Med Klin (Munich)* 2004;99(9):506–17.
 38. Momota H., Narita Y., Miyakita Y., Shibui S. Secondary hematological malignancies associated with temozolomide in patients with glioma. *Neuro Oncol* 2013;15(10):1445–50.
 39. Travis L.B., Holowaty E., Hall P. et al. Risk of leukemia following platinum-based chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med* 1999;340:351–7.
 40. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents. Lyon, 2000;76:177–239.
 41. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
 42. Schaapveld M., Aleman B.M.P., van Eggermond A.M. et al. Second cancer risk up to 40 years after treatment for Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015;373:2499–511.
 43. Travis L.B., Gospodarowicz M., Curtis R.E. et al. Lung cancer following chemotherapy and radiotherapy for Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(3):182–93.
 44. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceuticals. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2012;100(A)1–401.
 45. Curtis R.E., Boice Jr J.D., Shriner D.A. et al. Second cancers after adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(12):832–4.
 46. Curtis R.E., Freedman D.M., Sherman M.E., Fraumeni Jr J.F. Risk of malignant mixed müllerian tumors after tamoxifen therapy for breast cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2004;96(1):70–4.
 47. Matesich S.M., Shapiro C.L. Second cancers after breast cancer treatment. *Semin Oncol* 2003;30(6):740–8.
 48. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2013 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель. М., 2015. С. 14. [Statistics of malignant tumors in Russian and CIS countries in 2013. Eds. by: M.I. Davydov, E.M. Aksel'. Moscow, 2015. P. 14. (In Russ.).]
 49. Valdivieso M., Kujawa A.M., Jones T., Baker L.H. Cancer survivors in the United States: a review of the literature and a call to action. *Int J Med Sci* 2012;9:163–73.
 50. Meadows A.T., Friedman D.L., Neglia J.P. et al. Second neoplasms in survivors of childhood cancer: finding from the Childhood Cancer Survivor Study Cohort. *J Clin Oncol* 2009;27(14):2356–62.
 51. Шербенко О.И. Вторые опухоли у лиц, подвергавшихся противоопухолевой терапии в детском возрасте. Статистика, этиология, пути профилактики. Доступно по: http://vestnik.mccr.ru/vestnik/v13/paper/sherbenko_v13.htm. [Shcherbenko O.I. Second tumors at people, undergoing the antitumor therapy in childhood. Statistics, etiology, prophylactic methods. Available at: http://vestnik.mccr.ru/vestnik/v13/paper/sherbenko_v13.htm. (In Russ.).]
 52. Кулева С.А., Колыгин Б.А. Вторые опухоли, возникшие после терапии злокачественных опухолей у детей. Вопросы онкологии 2012;58(5):606–15. [Kuleva S.A., Kolygin B.A. Second tumors, arising after the therapy of malignant tumors at children. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2012;58(5):606–15. (In Russ.).]
 53. Субботина Н.Н., Долгополов И.Г., Менткевич Г.Л. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Детская онкология. Национальное руководство. Под ред. М.Д. Алиева, В.Г. Полякова, Г.Л. Менткевича, С.А. Маяковой. М.: Издательская группа РОНЦ, 2012. С. 261–272. [Subbotina N.N., Dolgoplov I.G., Mentkevich G.L. Transplantation of hematopoietic of stem cells. Children's oncology. National guidelines. Eds. by: M.D. Aliev, V.G. Polyakov, G.L. Mentkevich, S.A. Mayakova. Moscow: Izdatel'skaya grupa RONTs, 2012. Pp. 261–272. (In Russ.).]
 54. Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С., Моисеев И.С. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2015;2(2):28–42. [Afanas'ev B.V., Zubarovskaya L.S., Moiseev I.S. Allogeneic stem cell transplantation of hematopoietic stem cells at children: present time, challenges, prospects. *Russkiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Children's Hematology and Oncology* 2015;2(2):28–42. (In Russ.).]
 55. Passweg J.R., Baldomero H., Bader P. et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord transplants. *Bone Marrow Transplantation* 2015;50:476–82.
 56. Gratwohl A., Sureda A., Baldomero H. et al. Economics and outcome after hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective cohort study. *EBioMedicine* 2015;2(12):2101–9.
 57. Forrest D.L., Hogge D.E., Nevil T.J. et al. High-dose therapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation does not increase the risk of second neoplasms for patients with Hodgkin's lymphoma: a comparison of conventional therapy alone versus conventional therapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 2005;23(31):7994–8002.
 58. Pedersen-Bjergaard J., Andersen M.K., Christiansen D.H. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood* 2000;95:3273–9.
 59. Kalaycio M., Rybicki L., Pohlman B. et al. Risk factors before autologous stem-cell transplantation for secondary myelodysplasia and acute myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3604–10.
 60. Jagadeesh D., Woda B.A., Draper J., Evens A.M. Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations. *Curr Treat Options Oncol* 2012;13:122–36.
 61. Lowe T., Bhatia S., Somlo G. Second malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:121–34.
 62. Majhail N.S., Brazauskas R., Rizzo J.D. et al. Secondary solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation using busulfan-cyclophosphamide conditioning. *Blood* 2011;117(1):316–22.
 63. Grosse Y., Baan R., Straif K. et al. Special report: policy. A review of human carcinogens – Part A: Pharmaceuticals. Available at: www.thelancet.com/oncology
 64. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List of classification. pdf.
 65. Корман Д.Б. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. М.: Практическая медицина, 2014. 320 с. [Korman D.B. Targets and mechanisms of antitumor drugs' effect. Moscow: Practicheskaya meditsina, 2014. 320 p. (In Russ.).]

66. Iacovelli R., Pietrantonio F., Farcomeni A. et al. Chemotherapy or targeted therapy as second-line treatment of advanced gastric cancer. A systematic review and meta-analysis of published studies. *PLoS One* 2014;9(9):e108940.
67. Новые возможности таргетной терапии метастатического колоректального рака. *Онкология сегодня* 2016;(2):10–1. [New opportunities of the target therapy of the metastatic colorectal cancer. *Oncologiya segodnya = Oncology Today* 2016;(2):10–1. (In Russ.)].
68. Widakowich C., de Castro G. Jr, de Azambuja E. et al. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist* 2007;12:1443–55.
69. Kaplan W. Background paper 6.5. Cancer and cancer therapeutics. Priority Medicines for Europe and the World. Geneva: World Health Organization in collaboration with Utrecht University and Boston University, 2013.
70. Ильницкий А. П. Первичная профилактика рака: место и роль в противораковой борьбе. Информационный бюллетень. М., 2005. Вып. 1. С. 4–6. [Ильницкий А. П. Initial prophylactics of cancer: place and role in the fight against cancer. *News-bulletin*. Moscow, 2005. Ed. 1. Pp. 4–6. (In Russ.)].
71. Методические рекомендации. Модель региональной программы первичной профилактики рака. МР 2.2.9.0012–10. М., 2010. [Methodological recommendations. Model of the regional program of the primary cancer prevention. МР 2.2.9.0012–10. Moscow, 2010. (In Russ.)].
72. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». [Federal law dated 30.03.1999 No 52-ФЗ (ed. of 03.07.2016) “On the Sanitary & Epidemiologic Welfare of the Population”. (In Russ.)].
73. Schuz J., Espina C., Villiain P. et al. European Code against cancer 4th edn.: 12 ways to reduce your cancer risk. *Cancer Epidemiol* 2015;39(Suppl 1):1–10.
74. Первичная профилактика рака. Доступно по: www.ppr-info.ru. [Primary cancer prevention. Available at: www.ppr-info.ru. (In Russ.)].
75. Travis L.B., Wahnefried W.D., Allan J.M. et al. Aetiology, genetics and prevention of secondary neoplasms in adult cancer survivors. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:289–301.
76. Rosenthal A., Jacobs I. Familial ovarian cancer screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006;20:321–38.
77. Nekhlyudov L., Aziz N.M., Lerro C., Virgo K.S. Oncologists’ and primary care physicians’ awareness of late and long-term effects of chemotherapy: implications for care of the growing population of survivors. *JOP* 2014;10(2):29–36.
78. Freedman A.N., Seminara D., Gail M.H. et al. Cancer risk prediction models: a workshop on development, evaluation, and application. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(10):715–23.
79. Elena J.W., Travis L.B., Simonds N.I. et al. Leveraging epidemiology and clinical studies of cancer outcomes: recommendations and opportunities for translational research. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(2):85–94.



Вторые первичные опухоли у онкологических больных: лекарственный канцерогенез в онкологии

Г.А. Белицкий¹, Е.А. Лесовая^{1,2}, К.И. Кирсанов¹, М.Г. Якубовская¹

¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 9

Контакты: Геннадий Альтерович Белицкий belitsga@gmail.com

Цитостатики, используемые в химиотерапии, вызывают образование вторых первичных опухолей у некоторых больных, излеченных от первого новообразования. При этом риск возникновения вторых опухолей после излечения от первых повышается в 4–6 раз по сравнению с общей популяцией. В обзоре приведены современные данные о механизме злокачественной трансформации клеток цитостатиками, группах повышенного риска, связанного с врожденным полиморфизмом систем метаболизма ксенобиотиков и репарацией поврежденных ДНК. Наибольший риск лекарственных опухолей отмечен у пациентов с высокой активностью изоформ цитохрома P450, превращающего транспортные формы цитостатиков в активные электрофильные метаболиты, и с низким уровнем детоксицирующих ферментов. При прочих равных условиях в группу повышенного риска входят больные с низкой активностью ферментов репарации ДНК. Рассматриваются возможности исследования канцерогенного потенциала новых таргетных препаратов в эксперименте в целях минимизации риска возникновения вторых опухолей, обусловленных лечением.

Ключевые слова: лекарственный канцерогенез, вторая первичная опухоль, метаболизм химиотерапевтических препаратов, ингибитор топоизомеразы, алкилирующий агент

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-44–55

Second primary malignancies of cancer patients: treatment-related carcinogenesis

G.A. Belitskiy¹, E.A. Lesovaya^{1,2}, K.I. Kirsanov¹, M.G. Yakubovskaya¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²I.P. Pavlov Ryazan' State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vasokovol'tnaya St., Ryazan', 390026, Russia

Cytostatic drugs used in chemotherapy cause secondary tumors in some patients cured of the antecedent neoplasm. Thus the incidence of second neoplasia for cancer survivors compared with the general population represents a 4-fold to 6-fold increased risk. The review presents recent data on the mechanisms of malignant transformation of cells by cytostatics, on the characteristics of high-risk groups associated with congenital polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair systems. Increased risk of drug-related cancer was observed in patients with high activity of P450 isoforms, transforming cytotoxic prodrugs into the active electrophilic metabolites and low level of detoxifying enzymes. All things being equal the risk of therapy related neoplasia is higher in patients with low activity of DNA repair enzymes. It is evaluated the possibility of experimental study of new targeted drugs carcinogenic potential in order to minimize the future risk of secondary malignancies.

Key words: chemotherapy-induced carcinogenesis, second primary tumor, chemotherapy drug metabolism, topoisomerase inhibitor, alkylating agent

Канцерогенные цитостатики

Применяемые в настоящее время противоопухолевые цитостатики канцерогенны. У некоторых излеченных пациентов они вызывают образование вторых первичных опухолей — в основном острых миелоидных лейкозов, резистентных к терапии. В данном обзоре мы обозначаем их как вторые или лекарственные опухоли, поскольку рассматриваем осложнения только после химиотерапии. Масштаб проблемы можно представить на примере данных о доле этих опухолей, регистрируемых в развитых странах. В США, например, они составляют уже 18 % всех обнаруживаемых новообразований, а популяция излеченных больных, подверженных этому риску, превышает 13 млн человек,

т. е. приближается к 4 % всего населения США. Ранняя диагностика и терапия постоянно совершенствуются, и уже сейчас 60 % онкологических больных живут 5 и более лет, причем их число ежегодно возрастает [1].

Поскольку польза от применения канцерогенных цитостатиков превышает риск осложнений, они еще долго будут оставаться основным лечебным средством. В связи с этим значительно повышаются требования к рациональному их использованию, т. е. наибольшей эффективности и минимальному риску канцерогенеза. Решение этой задачи невозможно без представления о генетическом и эпигенетическом статусе как опухоли, так и организма. Первое необходимо для рационального подбора протокола лечения, второе — для пони-

мания степени риска индукции лекарственной опухоли и, в зависимости от этого, корректирования протокола в каждом конкретном случае.

По решению Международного агентства по изучению рака (МАИР) 11 из широко применяемых в настоящее время препаратов или их комбинаций отнесены к группе 1 канцерогенной опасности, т. е. признаны несомненными канцерогенами для человека (см. табл. 2, обзор Л.Г. Соленовой). К группам 2А и 2В, т. е. к соединениям с весьма вероятной или возможной канцерогенностью, отнесены цитостатики, для окончательной оценки которых эпидемиологических данных пока недостаточно, но имеются четкие результаты, свидетельствующие об их мутагенности в системах *in vitro* и *in vivo*, способности трансформировать клетки в культуре и/или вызывать опухоли у животных (табл. 1).

Таблица 1. Препараты с вероятной или возможной канцерогенностью для человека (группы 2А и 2В по данным Международного агентства по изучению рака, адаптировано из [2])

Препарат	Группа опасности
Азациитидин	2А
Прокарбазин гидрохлорид	2А
Тенипозид	2А
Цисплатин	2А
Дауномицин	2В
Медроксипрогестерона ацетат	2В
Мелфалан (сарколизин)	2В
Метилтиоурацил	2В
Метронидазол	2В
Митомицин С	2В
Митоксантрон	2В
Прогестины	2В
Стрептозотозин	2В
Тиоурацил	2В

За время существования этого регистра МАИР часть препаратов группы 2А были переведены в группу 1. Как показал опыт, все эти цитостатики потенциально опасны не только для пациентов, у которых нет альтернативы их применения, но и для персонала, работающего с ними.

Что касается нового поколения препаратов, в особенности таргетного назначения, их канцерогенность проявится в эпидемиологических исследованиях не ранее, чем через десятилетие после начала массового применения, т. е. когда к ним будет экспонирован значительный контингент излеченных больных. В то же

время уже сейчас уровень знаний молекулярных механизмов канцерогенеза и синдромов, повышающих вероятность индукции лекарственных опухолей, позволяет проводить экспериментальные исследования, прогнозирующие эти осложнения, и стратифицировать таргетные препараты по степени канцерогенной опасности. Существенным представляется изучение влияния таргетных препаратов на риск канцерогенного действия традиционных цитостатиков, поскольку обычно они применяются в единых лечебных комбинациях.

Механизмы лекарственного канцерогенеза

Опухоли, вызванные цитостатиками, как и большинство злокачественных новообразований, имеют моноклональное происхождение, т. е. возникают из одной клетки в результате относительно редкой комбинации событий, специфически дестабилизирующих геном. В случае острых лекарственных миелолейкозов (ОЛМЛ) это могут быть реципрокные транслокации с образованием химерных структур, в которых активированы протоонкогены или мутации генов, связанные с контролем пролиферации или дифференцировки. Некоторые из этих изменений характерны для цитостатиков и позволяют отдифференцировать вызванные ими новообразования от первичных. Известно, что многие канцерогены вызывают в трансформируемых клетках специфические изменения. В частности, трансверсия Arg → Ser в 3-м нуклеотиде кодона 249 гена *p53* возникает при действии афлатоксина В1, а кодона 145 — при действии канцерогенов табачного дыма. Аналогично этому клетки лекарственного миелоидного лейкоза также имеют характерные изменения, которые указывают на тип препарата, применявшегося для лечения первой опухоли. Общим ранним показателем развития этого осложнения являются сбалансированные транслокации 11q23 и 21q22. При этом для ингибиторов топоизомеразы, помимо вышеупомянутых, характерна транслокация 3q26, а для алкилирующих агентов — делеция хромосом 5 и 7 (табл. 2) [3].

При делеции хромосомы 7 существенно нарушение экспрессии гена *EZH2* семейства *Polycomb*, локализованного в 7q36.1. Экспрессируемая им метилтрансфераза относится к группе эпигенетических регуляторов, которые, модифицируя гистоны, ингибируют активность многих генов. Механизм ее действия состоит в том, что в результате метилирования лизиновых остатков H3-гистонов в положении 27 (H3k27) происходят ремоделирование хроматина и изменение способности транскрипционных факторов связываться с промоторами. Выключение функций этой метилтрансферазы предотвращает созревание миелобластов и способствует их превращению в стволовые опухолевые клетки [5, 6]. Из других изменений для ОЛМЛ характерны мутации *TP53*, а также компонентов сигнального пути EGFR, в частности в каскаде RAS—BRAF, приводящие к неконтролируемой стимуляции размножения. При изменениях в хромосоме 5 чаще всего проявляются

Таблица 2. Сравнение особенностей вторичных острых миелолейкозов, вызванных применением ингибиторов топоизомеразы II и алкилирующих агентов (адаптировано из [4])

Нарушение/особенность группы пациентов	Класс химиопрепарата	
	ингибиторы топоизомеразы II (этопозид, тенипозид, митоксантрон, эпирубицин)	алкилирующие агенты и производные нитрозомочевины (циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, кармустин, ломустин)
Хромосомные aberrации	Рearанжировки <i>MLL</i> -генов, <i>t(15;17)(PML-RARα)</i> , <i>t(8;21)(AML1-ETO)</i> , <i>inv(16)</i> или <i>t(16;16)(p13q22)</i> , [<i>CBFβ-MYH11</i>]	Моносомия или делеция хромосом 5 и 7
Среднее время до развития острых лекарственных миелолейкозов, годы	2–3	5–7
Комплексные поломки кариотипа	Редко	Часто
Предшествующий миелодиспластический синдром	Редко	Часто
Характерный возраст больных	Молодые	Пожилые

мутации гена *NPM1*, кодирующего многофункциональный шаперон — ядрышковый белок нуклеофозмин, функции которого существенны для транскрипции рибосомных генов и биогенеза рибосом, а также для регуляции клеточного цикла и апоптоза [7].

Поскольку превращение нормальных клеток в злокачественные при воздействии цитостатиков происходит не одномоментно, его признаки могут быть обнаружены заблаговременно. Например, характерные хромосомные транслокации на ранних стадиях миелодиспластического или миелолипролиферативного синдромов, предшествующих развитию ОЛМЛ, выявляются цитогенетическими методами или с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. В этих случаях также могут быть обнаружены и некоторые характерные мутации. В частности, при исследовании методом полногеномного секвенирования в сменяющихся клонах миелобластов при переходе миелодиспластического синдрома в ОЛМЛ был прослежен спектр мутаций, наиболее характерных для этого динамического процесса. Изменения касались генов *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1*, *TP53* и *NRAS*. В случае миелофиброза, также предшествующего ОЛМЛ, из 649 найденных однонуклеотидных замен (по сравнению с исходным генотипом клеток кожи) только 2, связанные с мутациями в драйверных последовательностях, были характерны для злокачественных клонов. Одна из них обнаружена в гене *IDH1*, мутации которого ингибируют образование NADPH, необходимого для восстановления антиоксидантной функции глутатиона. В результате этой мутации резко усиливается повреждение ДНК генотоксическими агентами, в том числе цитостатиками. Мутации промотора гена *RUNX1* приводят к миелоидным транслокациям, в числе которых находится образование химерного гена, из 5'-области гена *RUNX1* и 3'-области гена *CBFA2T3*. Продукт этого гена является ингибитором транскрипции многих генов, в том числе связанных с дифференцировкой миелобластов [8, 9].

Факторы предрасположенности к лекарственному канцерогенезу

Полиморфизм систем метаболизма цитостатиков.

Подобно другим канцерогенным ксенобиотикам, цитостатики делятся на соединения прямого действия, активные в своем исходном состоянии, и транспортные формы, превращающиеся в активные метаболиты только после ферментной активации в клетке. Активируемые клеткой соединения метаболизируются в 2 этапа. На 1-м этапе происходит их превращение в электрофильные метаболиты, реагирующие с любыми нуклеофильными мишенями, в том числе с ДНК и другими макромолекулами; на 2-м эти метаболиты нейтрализуются. Основная система, активирующая химические цитостатики, — система цитохрома P450 (CYP). Детоксикация происходит в основном с помощью глутатион-S-трансфераз (glutathione S-transferases, GST) и НАДФН-зависимой хиноноксиредуктазой 1 (NQO1). GST детоксицирует электрофильные метаболиты доксорубина, ломустина, бусульфана, хлорамбуцила, цисплатина, циклофосфамида, мелфалана и других подобных им соединений. Полиморфизм активирующих и детоксицирующих ферментов наследуется независимо, поэтому в популяции имеются варианты всех сочетаний. Очевидно, что при прочих равных условиях у больных с высоким уровнем активирующих ферментов и низкой активностью детоксицирующих лечебный эффект должен быть повышенным так же, как и риск возникновения лекарственных опухолей, и наоборот, в случае слабой активации и усиленной детоксикации.

Классический пример цитостатика, эффект которого зависит от метаболических превращений в клетке, — широко применяемый циклофосфамид. Его исходная молекула активируется изоформами CYP2B6, 3A4, 3A5, 2C9 до 4-гидрокси-циклофосфамида, который затем превращается в непосредственные цито- и генотоксические производные азотистого иприта, образу-

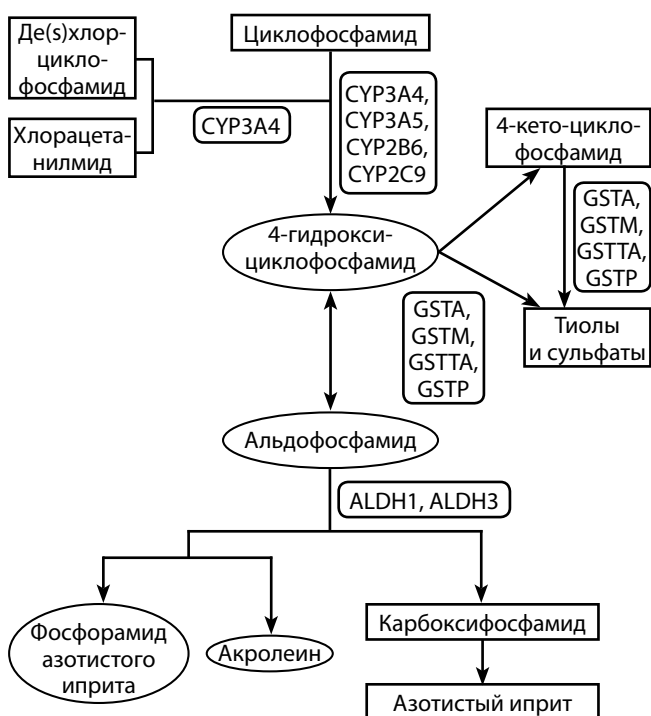


Рис. 1. Метаболизм циклофосфамида (адаптировано из [10]). CYP3A4 – цитохром P450, семейства 3, подсемейства A, полипептид 4; CYP3A5 – цитохром P450, семейства 3, подсемейства A, полипептид 5; CYP2B6 – цитохром P450, семейства 2, подсемейства B, полипептид 6; CYP2C9 – цитохром P450, семейства 2, подсемейства C, полипептид 9; GSTA – глутатион-S-трансфераза α; GSTM – глутатион-S-трансфераза μ; GSTT – глутатион-S-трансфераза θ; GSTP – глутатион-S-трансфераза π; ALDH1 – алкогольдегидрогеназа I; ALDH3 – алкогольдегидрогеназа 3

ющие аддукты ДНК преимущественно в положении N7. Из них около 26 % являются моноаддуктами и 7 % образуют наиболее цито- и генотоксические поперечные сшивки N7-гуанин-N7-гуанин.

Инактивация метаболитов циклофосфамида до тиолов и сульфатов осуществляется с помощью глутатион-S-трансфераз GSTA, GSTM, GSTT и GSTP (рис. 1) [10, 11].

Показано, что наличие аллеля с валином в кодоне 105 гена *GSTP1*, обладающего резко сниженной детоксицирующей способностью, коррелирует с повышенным риском развития вторичного миелолейкоза и миелодисплазии у пациентов, леченных препаратами, которые инактивируются *GSTP1*. Полиморфизм по 2 другим генам – *GSTM1* и *GSTT1* – не коррелирует с лекарственным миелолейкозом [12].

Канцерогенные цитостатики прямого действия, активные в своем первоначальном состоянии, в клетке подвергаются только инактивации. Это относится, например, к камптотецину – ингибитору топоизомеразы I. Другой ингибитор топоизомеразы I – топотекан – инактивируется путем рН-зависимого гидролиза лактоновой группы с превращением в неактивную карбоксильную форму, и его эффект практически не связан с изоформами CYP (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8/9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E, CYP3A, CYP4A) [13].

Другой широко используемый ингибитор топоизомеразы I – иринотекан. Активным компонентом данного препарата является его метаболит SN-38, который образуется при гидролизе карбоксилэстеразами (CES1 и CES2) в печени [14]. Считается, что именно SN-38 определяет все биологические свойства иринотекана, включая как терапевтические, так и побочные действия. При детоксикации SN-38 подвергается глюкуронизации (с образованием SN-38G) с помощью уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазы (UGT1A1). Полиморфизм и мутации этого гена могут также значительно влиять на терапевтические и общетоксические свойства иринотекана. Так, значимыми для индивидуального дозирования оказались мутации UGT1A1*28 и UGT1A1*6, приводящие к резкому снижению уровня экспрессии UGT1A1 [15, 16]. Альтернативным путем инактивации иринотекана считается его окисление с помощью изоформ цитохрома P450 семейства CYP3A (CYP3A4 и CYP3A5). При этом образуются неактивные аминопроизводные камптотецина APC и NPC. NPC может превращаться в SN-38 с помощью CES1 и CES2. Предполагалось, что генотипирование изоформы CYP3A поможет индивидуализировать фармакокинетический профиль, однако масштабные исследования не выявили явных корреляций изоформ цитохрома с терапевтической активностью иринотекана [17].

В то же время производные подофиллотоксина, ингибирующие топоизомеразу II, превращаются с помощью CYP в активные хиноны. Это осуществляется изоформами цитохрома P450 CYP3A4 и CYP3A5 [18]. Было показано, что соединения, тем или иным образом влияющие на активность или экспрессию этих изоформ, в частности глюкокортикоиды, значительно ускоряют выведение препарата [19]. Активацию этопозида с превращением его в O-деметилированные производные могут осуществлять также простагландинсинтазы или миелопероксидазы [20, 21].

В 1998 г. С.А. Felix и соавт. продемонстрировали, что при лечении этопозидом и тенипозидом вторичные опухоли развиваются реже у больных с герминативной транслокацией гена *MLL*, при которой наблюдается «ингибирующий» полиморфизм промотора гена *CYP3A4* (вариант *CYP3A4-V*) в отличие от больных с активным диким типом *CYP3A4-W*. При этом повышенный канцерогенный эффект связывали с тем, что дикая изоформа более интенсивно превращает производные эпидофиллотоксина в катехолы и хиноны [22]. Однако при доскональном исследовании промотора показано, что функциональная разница между диким и мутантным аллелями незначительна [23, 24]. В 2005 г. были представлены еще 2 работы, в одной из них были приведены данные о протективном действии варианта *CYP3A4-V* в отношении вторичного канцерогенеза [25], а в другой говорилось об отсутствии ассоциации между типом аллеля и вторичным канцерогенезом [26]. Таким образом, на сегодняшний день этот вопрос остается открытым.

Другой вариант корреляции профиля активности ферментов, метаболизирующих ксенобиотики, с риском развития ОЛМЛ касается НАДФ-Н хиноноксиредуктазы 1 (NQO1), которая превращает хиноны в менее мутагенные для клеток гемопоэза гидрохиноны. Ее неактивный вариант, экспрессирующийся при наличии точковой мутации в кодоне 187 (Pro—Ser), встречается значительно чаще у больных с ОЛМЛ, чем в общей популяции или в случае первичного миелолейкоза [27].

В клетках человека функционируют более 48 адензинтрифосфатсвязывающих каскад трансмембранных транспортных белков, в числе которых присутствует Р-гликопротеин — белок множественной лекарственной устойчивости 1, (ABCB1/MDR1), удаляющий из клетки противоопухолевые цитостатики. Логично было бы ожидать, что полиморфизм гена *ABCB1* должен стать предметом активного изучения, поскольку он может отразиться на предрасположенности к канцерогенному действию цитостатиков, однако данные по этому вопросу скудны и противоречивы. В одном из экспериментов показано, что низкая активность Р-гликопротеина стимулирует возникновение спонтанных опухолей кишечника у мышей трансгенной линии *Apc^{Min/+}*, предрасположенных к этой патологии. Трансфекция этих животных аллелем *mdr1a^{-/-}*, снижающим активность Р-гликопротеина, неожиданно уменьшила также и количество возникающих опухолей. При этом, в противоположность мышам линий *mdr1a^{+/+}*, *Apc^{Min/+}*, у которых наблюдалась интенсивная гибель энтероцитов, поврежденных различными факторами пищи, эпителий кишечника трансфицированных животных (*mdr1a^{-/-}*, *Apc^{Min/+}*) повреждался меньше, что, по-видимому, давало возможность выживать клеткам с нелетальными повреждениями, в том числе и предрасполагающими к злокачественному перерождению [28].

Имеются данные о том, что однонуклеотидная замена rs9561778 в *ABCC4* коррелирует с повышенной токсичностью циклофосфамида, в частности со степенью выраженности лейкопении [29]. И наоборот, полиморфизм С-Т в *MDR1* в положении 3435 (С-аллель) коррелирует со значительным повышением активности экспрессируемого белка, что должно было бы снижать генотоксический эффект канцерогенов, а следовательно, и риск вторичных опухолей. Клинических подтверждений этого найти не удалось. Более того, в одной из работ показано, что частота встречаемости С-аллеля у пациентов с ОЛМЛ не отличалась от фонового уровня в здоровой популяции [30].

Полиморфизм систем репарации ДНК. Как лечебные, так и канцерогенные эффекты цитостатиков связаны в основном с повреждением ДНК. В связи с этим важнейшую роль в проявлении этих эффектов играют системы репарации и их полиморфизм (табл. 3).

В частности, основной механизм действия ингибиторов топоизомеразы I — образование комплекса с ферментом ДНК-топоизомеразой I, необходимым для репликации. Производные подофиллотоксина, инги-

бирующие топоизомеразу II, стабилизируют комплекс ДНК с ДНК-топоизомеразой II. Оба эти процесса приводят к появлению многочисленных двуцепочечных разрывов [32]. В связи с этим противоопухолевая и канцерогенная активность ингибиторов топоизомеразы I в значительной мере зависит от активности ферментов репарации и контроля клеточного цикла. Существенным для этих процессов является уровень экспрессии белка эксцизионной репарации XRCC1 [33], белка репликации CDC45L [34], белка сумоилирования SUMO1 [35] и ряда других.

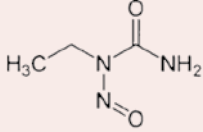
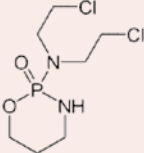
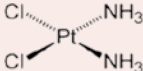
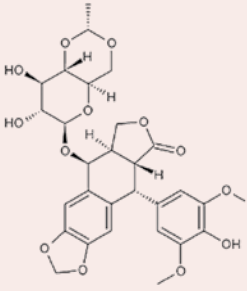
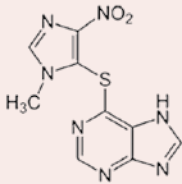
Оценка роли генетических факторов в чувствительности нормальных тканей пациента к канцерогенному действию химиопрепаратов относительно легка, если речь идет о наследуемых аномалиях генов высокой пенетрантности, таких как *BRCA1* и *BRCA2* или 1 из 4 генов репарации мисмэтчей (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) при синдроме Линча. Помимо этих аномалий повышенный риск возникновения вторичных опухолей после химио- или радиотерапии отмечен у больных с синдромом Ли—Фраумени [36], ретинобластомой [37], нейрофиброматозом [38], синдромом Горлина, при которых в результате мутации гена *PTCH1* на хромосоме 9 у больных развиваются невоидные базальноклеточные карциномы [39], или при герминальных гетерозиготных мутациях гена *WT1*, вызывающих опухоль Вильмса [40].

У больных анемией Фанкони вследствие нарушения репарации ДНК резко повышена чувствительность к алкилирующим соединениям. У них при дозе циклофосфамида в 10 раз меньшей, чем у пациентов без этого синдрома, в клетках крови обнаруживается одинаковое количество аддуктов N7-гуанин — N7, ответственных за цитотоксические и мутагенные эффекты, вызванные поперечными сшивкам нитей ДНК (см. табл. 3) [11, 41].

Эти синдромы относительно редки, и основной вклад в возникновение вторичных опухолей после химиотерапии вносят аномалии более слабых аллелей, в основном связанные с репарацией ДНК. В их числе те же мутации, которые способствуют образованию первичных опухолей. Например, атипичные варианты гена *CDKN2A*, связанные с возникновением первичных меланом, которые, даже при своей относительно низкой пенетрантности, увеличивают риск вторичного канцерогенеза после лечения цитостатиками [42].

Повышенный риск возникновения лекарственных миелодисплазий и ОЛМЛ отмечен в случае полиморфизма факторов гомологичной рекомбинации RAD512135C и XRCC32241, являющихся частью комплексов XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, Rad51D [43, 44]. То же самое известно относительно полиморфизма *ERCC2*, одного из генов группы D эксцизионной репарации, экспрессирующего хеликазу. В случае замены лизина на глутамин в кодоне 751 ее активность резко снижается, что коррелирует с повышенным риском возникновения ОЛМЛ [45, 46].

Таблица 3. Генотоксические эффекты и механизмы репарации поврежденных ДНК, вызванных цитостатиками (адаптировано из [31])

Группа	Структура	Генотоксический эффект	Основной механизм репарации
Монофункциональные алкиляторы			
Этилнитрозомочевина Прокарбазин Дакарбазин Тимозоломид		Повреждение оснований Нарушение репликации Образование аддуктов	Деметилирование метилтрансферазами Эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов Гомологичная рекомбинация Репарация по типу анемии Фанкони
Бифункциональные алкиляторы			
Циклофосфамид Ифосфамид Митомycin C Мелфалан Хлорамбуцил		Повреждение оснований Нарушение репликации Образование аддуктов Алкильные сшивки Двучепочные разрывы	MGMT BER NER Гомологичная рекомбинация Репарация по типу анемии Фанкони
Цисплатин Карбоплатин			
Ингибиторы топоизомеразы			
Этопозид Доксорубин Даунорубин Эпирубин Митоксантрон Камптотecin		Одноцепочечные разрывы Двучепочные разрывы Нарушение репликации	Негомологичная рекомбинация Гомологичная рекомбинация Репарация по типу анемии Фанкони
Антиметаболиты			
Азатиоприн Флударабин Кладрибин 5-фторурацил		Повреждение оснований Нарушение репликации	BER

Примечание. MGMT – Об-метилуанин-ДНК-метилтрансфераза; BER – эксцизионная репарация оснований; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов.

Описан и более сложный вариант предрасположенности к вторичным опухолям, который наблюдался у больных с полиморфизмом *MDM2* TT *TP53 Arg/Arg* в сочетании с аллелем *G MDM2* плюс аллель *TP53 Pro*. Риск в этом случае был повышен только у пациентов, ранее получавших алкилирующие агенты, но не лучевое лечение [47].

У больных, излеченных от лимфогранулематоза метилирующими препаратами типа прокарбазина, отмечен повышенный риск возникновения ОЛМЛ и рака молочной железы в случае наличия у них полиморфизма *MLH1* (по 93-му положению в промоторе), который ингибирует репарацию неспаренных оснований и способствует накоплению мутаций в микросателлитных последовательностях [48].

Наличие мутантного аллеля не всегда способствует канцерогенезу. Это, в частности, относится к полиморфному локусу кодона 399 гена *XRCC1*, который является важным регулятором системы эксцизионной репарации. Его однонуклеотидный полиморфизм Arg399Gln (замена аргинина на глицин) приводит к экспрессии белка с пониженной активностью. Наличие такого аллеля коррелирует, с одной стороны, с возникновением и злокачественным течением ряда первичных опухолей, с другой – препятствует развитию ОЛМЛ. Предполагается, что в этом случае повреждения генома, вызываемые в нормальных миелобластах цитостатиками или облучением, не репарируются, и клетки уходят в апоптоз. В случае дикого аллеля слабые повреждения могут репарироваться не только с полным

восстановлением, но и аномально по механизму негомологичной рекомбинации, с последующей злокачественной трансформацией [49].

Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), катализирующая восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата до 5-метилтетрагидрофолата с последующим образованием S-аденозилметионина, необходима для метилирования ДНК, что среди других ее функций ингибирует экспрессию онкогенов. Ее полиморфизм в случае гомозиготной мутации С677Т, препятствующей связыванию фолата, коррелирует с нарушением репарации ДНК, наличием хромосомных aberrаций в клетках гемопоэза и повышенной частотой возникновения лекарственных миелодисплазий. В частности, в одном из исследований такое отдаленное осложнение значительно чаще возникало у больных с однонуклеотидным полиморфизмом 677 и 1298 (гаплотип 677Т1298А) после лечения рака молочной железы и у пациентов с гаплотипом 677С1298С после лечения онкологических заболеваний кроветворной системы [50].

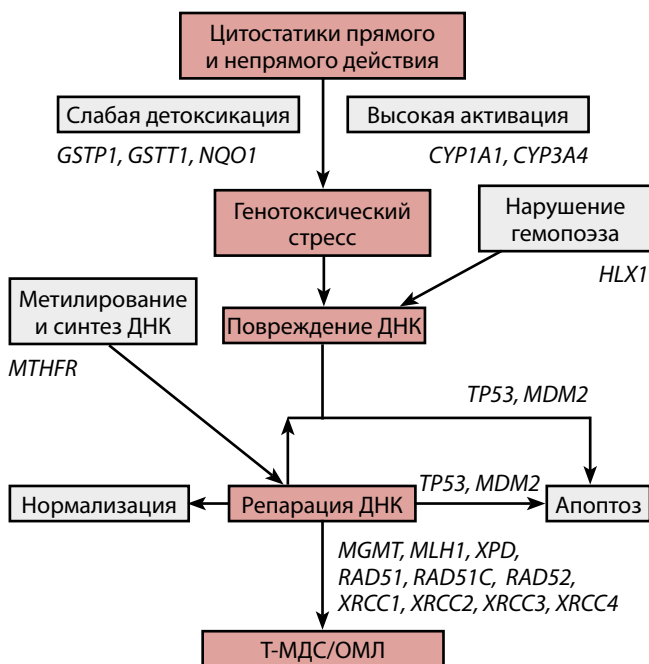


Рис. 2. Генетические факторы, полиморфизм которых влияет на лекарственный канцерогенез (адаптировано по [51]).

GSTP1 – глутатион-S-трансфераза π 1; *GSTT1* – глутатион-S-трансфераза μ 1; *NQO1* – НАДФН дегидрогеназа, хинон 1; *CYP1A1* – цитохром P450, семейства 1, подсемейства A, полипептид 1; *CYP3A4* – цитохром P450, семейства 3, подсемейства A, полипептид 4; *MTHFR* – метилентетрагидрофолатредуктаза НАДФН; *HLX1* – транскрипционный фактор гемопоэза; *TP53* – белок-супрессор опухолевого роста; *MDM2* – мышинный протоонкоген; *E3* – убиквитинлигаза; *MGMT* – O-6 метилгуанин-ДНК метилтрансфераза; *MLH1* – гомолог гена репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, аналог *mutL1* у *E. coli*; *MSH2* – аналогичный гомолог *mutS2*; *XPB* – гены группы эксцизионной репарации *ERCC* комплементарные генам *XP* (обуславливающим развитие пигментной ксеродермы); *RAD51* – рекомбиназа; *RAD51C* – аналог *RAD51*; *RAD52* – рекомбиназа; *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4* – белки системы негомологичного воссоединения двуниевых разрывов ДНК; Т-МДС/ОМЛ – миелодиспластический синдром/ОМЛ, вызванные лечением первичной опухоли

На рис. 2 изображены основные факторы, способствующие возникновению отдаленных онкологических осложнений после химиотерапии. Интенсивное повреждение ДНК происходит при повышенной активации цитостатиков изоформами CYP в сочетании с пониженной детоксикацией ферментами типа GSTP1 и NQO1 электрофильных метаболитов или прямых мутагенов.

Неполное восстановление ДНК происходит вследствие измененной активности ферментов репарации (XRCC1, XRCC3, RAD51, ERCC2, MLH1) или ингибирования апоптоза (TP53, MDM2). Извращенный вариант гемопоэза (HLX1) в сочетании с высоким уровнем пролиферации и пониженной активностью MTHFR и TP53 увеличивает риск возникновения лекарственных миелодисплазий.

Большинство вторых опухолей солидного строения появляется после лучевой терапии, которая индуцирует метакронные рак молочной и щитовидной желез, саркомы, опухоли мозга, базалиомы и другие более редкие опухоли. Их возникновение ассоциируется с наличием 2 видов полиморфизма в хромосоме 6q21, причем только у пациентов, излеченных от лимфогранулематоза в детстве. Следствием этого полиморфизма, вызванного, по-видимому, облучением, считается низкий базальный уровень экспрессии гена *PRDM1* с образованием aberrантного белка PRDM1, который в норме является ингибитором β -интерферона. В норме белок PRDM1, известный также как Blimp-1, необходим для созревания стволовых клеток гемопоэза [52].

Важную роль в генезе пострадиационных опухолей молочной железы играет полиморфизм гена *ATM*, кодирующего серин/треониновую протеинкиназу, в функции которой входит индукция остановки клеточного цикла в случае разрывов ДНК, особенно двуниевых, с последующим апоптозом клетки или репарацией повреждений. Дефекты белка ATM ответственны за некорректную репарацию поврежденной ДНК, в результате которой могут возникать потенциально злокачественные генотипы [53].

Препараты, используемые для гормональной терапии, также могут вызывать возникновение опухоли. Их развитие связано с нарушениями, которые могут вносить в сигнальные системы клетки используемые препараты и/или их активные метаболиты. Большинство гормональных препаратов метаболизируется путем сульфатирования, гидроксирования и глюкуронирования до менее активных или неактивных. Это относится к эстрогенам и их производным – прогестинам, кортикостероидам, селективным супрессорам эстрогенового рецептора, ингибиторам ароматазы, антиандрогенам, суперагонистам LH-RH, супрессорам коры надпочечников и гормонам щитовидной железы.

Канцерогенность некоторых из них известна. В частности, тамоксифен, как антагонист эстрогенового рецептора, блокирует его активность путем образования комплекса и тем самым угнетает пролиферативную активность опухолевых клеток, положительных по нали-

цию рецепторов эстрогенов и/или прогестерона. При лечении рака молочной железы он снижает риск возникновения эстроген-положительной контралатеральной опухоли, но при этом риск развития гормоннезависимого варианта увеличивается более чем в 4 раза [54].

В группу 1 канцерогенов человека тамоксифен был отнесен вследствие его способности вызывать развитие рака матки. Механизм этого эффекта связывают с особенностями его действия на клетки молочной железы и эндометрия. Основанием для одной из гипотез относительно его канцерогенного действия послужил тот факт, что у крыс тамоксифен вызывает гепатоцеллюлярные опухоли печени. Предполагается, что это связано со спецификой его метаболических превращений в электрофильные алкилирующие соединения, которые образуют аддукты в ДНК. Аналогичная возможность, связанная с различиями метаболизма в клетках молочной железы и эндометрия, не исключена и для человека [55].

Также известна канцерогенность эстрогенов. Избыточное их накопление является фактором риска развития рака тела матки. Они действуют как иницирующие факторы и как промоторы. По первому механизму такие метаболиты эстрогена и эстрадиола, как катехолэстрогены и 16 α -ОНЕ1, активно модифицируют основания ДНК [56]. Для остальных гормональных препаратов в литературе нет прямых указаний на возможность индукции ими вторичных опухолей, хотя косвенные предпосылки к этому имеются.

Данных о развитии опухолей после терапии, включающей глюкокортикоиды, нет. Однако они могут вызывать иммунный дисбаланс, облегчающий пролиферацию aberrантных В-клеток и, следовательно, увеличивать риск развития заболевания неходжкинскими лимфомами [57].

Тестостерон в тканях-мишенях метаболизируется в более активный дигидротестостерон, накопление которого приводит к гиперпластическим изменениям в предстательной железе, однако рак этого органа возникает у пожилых мужчин на фоне возрастной инволюции семенников и снижения содержания тестостерона в крови. В связи с этим экспериментальные модели индукции рака предстательной железы у животных путем введения высоких доз тестостерона не представляются адекватными процессу злокачественной трансформации клеток предстательной железы у человека.

Для прогестинов показано уменьшение риска возникновения рака эндометрия при их приеме [58], однако существуют сведения об увеличении риска развития рака молочной железы у собак [59]. Экстраполяция полученных данных на человека затруднена очень высокими дозами, применявшимися у животных. Также было показано увеличение частоты встречаемости рака эндометрия у макак-резусов, но эти результаты противоречат данным о снижении риска развития рака эндометрия у человека.

Аналогичные данные относительно корреляции повышенной частоты возникновения вторичных солидных опухолей, вызванных облучением, с наличием генетических полиморфизмов описаны в многочисленных публикациях, подробное рассмотрение которых не входит в задачу данного обзора, посвященного канцерогенному действию химических цитостатиков [51].

Канцерогенный риск таргетных препаратов

Сведения об отдаленных осложнениях применения монотерапии таргетными препаратами появляются главным образом при лечении аутоиммунных заболеваний. В случае онкопатологии в такой форме они используются редко. Обычно таргетные препараты входят в комплексные схемы лечения вместе с классическими цитостатиками. В связи с этим трудно отделить их отсроченные эффекты от действия других препаратов. Имеющиеся немногочисленные публикации в этом направлении касаются в основном ритуксимаба, относительно действия которого накопилось достаточно клинических данных, поскольку он был введен в практику для лечения неходжкинских лимфом еще в 1997 г. Помимо того, что ритуксимаб используется в виде монотерапии, его часто комбинируют с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (R-СНОР). Известны и другие комбинации: ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, этопозид и преднизолон (R-СНVP); ритуксимаб, циклофосфамид, винкристин и преднизолон (R-СVP); ритуксимаб, флударабин, циклофосфамид и митоксантрон (R-FCM); ритуксимаб, митоксантрон, хлорамбуцил, преднизолон (R-МCP) [60, 61].

Действие этого моноклонального иммуноглобулина связано с избирательным ингибированием трансмембранного белка CD20, который является одним из регуляторов активации и пролиферации В-лимфоцитов. В одном из наиболее обширных исследований последнего времени, в котором для лечения В-клеточных лимфом применяли высокие дозы химиопрепаратов с последующей аутотрансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, показано, что при включении в терапевтическую комбинацию ритуксимаба общая выживаемость значительно повышается, но при этом увеличивается и частота вторичных солидных опухолей при незначительном увеличении частоты миелодисплазий и острых лейкозов [62].

Этот эффект рассматривается не только как следствие увеличения продолжительности жизни больных, но связывается и со спецификой действия ритуксимаба, который ингибирует пролиферацию как опухолевых лимфоцитов, так и прекурсоров нормальных В-клеток, угнетая таким образом этот сегмент противоопухолевой защиты. Известно также, что при его изолированном применении для лечения аутоиммунных заболеваний развивается выраженный агранулоцитоз. Сочетание этих эффектов с действием мутагенных препаратов, входивших в использовавшуюся лечебную комбина-

цию R-СНОР, могло способствовать пролиферации трансформированных предшественников соматических клеток, у которых не экспрессируется белок CD20. Наибольшее количество вторичных опухолей выявлено в группах, в которых ритуксимаб применяли в сочетании с высокими дозами цитарабина, обладающего выраженными иммунодепрессивными свойствами [63, 64].

Применение другого моноклонального антитела — ибритумомаб тиуксетана, также направленного на таргетное ингибирование CD20, способствовало повышению риска вторичного миелодиспластического синдрома и/или миелолейкоза у 5,2 % больных, излеченных от лимфогранулематоза с помощью этого препарата, как в виде монотерапии, так и в сочетании с ритуксимабом. Аналогичный отсроченный канцерогенный эффект наблюдался у больных лимфогранулематозом после применения тозитумомаба, в том числе конъюгированного с радиоактивным йодом I-131 (Веххар®). Этот препарат, разрешенный к использованию в 2003 г., был снят с производства спустя 11 лет из-за отсутствия эффективности, малого спроса и неприемлемых осложнений после его применения.

Среди механизмов таргетного воздействия на опухолевые клетки активно разрабатываются способы непосредственной активации в них рецепторов апоптоза. Одним из наиболее изучаемых лигандов этих рецепторов является цитокин семейства факторов некроза опухоли TRAIL/Аро2L, который активирует 2 рецептора смерти: TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5. Предклинические и клинические испытания этого лиганда показали его приемлемую токсичность и противоопухолевый эффект у части больных [65, 66]. В то же время получены данные о том, что агонист рецептора смерти TRAIL/Аро2L вызывает в нормальных клетках мутации в результате активации эндонуклеазы CAD. При сравнении мутагенного действия лигандов TRAIL и прямого мутагена этилметансульфоната на культуру лимфобластов в локусах синтеза пуриновых нуклеотидов (HPRT) и включения дезокситимидина в ДНК (TK1) показано, что этилметансульфонат вызывает инактивирующие мутации по механизму транзиций, тогда как TRAIL индуцировал в основном полные или частичные делеции генов HPRT и TK1. Последнее сочеталось с наличием большого числа двойных разрывов, которые могут aberrантно восстанавливаться путем негомологичной рекомбинации. Эффект касался как опухолевых, так и нормальных клеток. Как и в случае действия других цитостатиков, это может послужить основанием для выживания поврежденных стволовых клеток с аномальным генотипом и последующим их превращением в опухолевые, т. е. стать причиной возникновения вторичных опухолей [67].

Сведений о возможном канцерогенном потенциале таргетных ингибиторов протеинкиназ на сегодняшний день нет, однако косвенные данные свидетельствуют, по крайней мере, о способности одного из них усиливать мутагенное действие генотоксических кан-

церогенов. Показано, что gefитиниб усиливает мутагенный эффект бенз(а)пирена при совместном действии на клетки культуры легочной ткани. Являясь селективным ингибитором тирозинкиназы рецепторов эпидермального фактора роста, он ингибирует сигнальный путь ERK1/2 и, соответственно, экспрессию белка RAD51, необходимого для репарации двунитевых разрывов ДНК. Представляет интерес изучение возможности усиления мутагенного и канцерогенного действий цитостатиков на нормальные клетки при их комбинации с gefитинибом и другими ингибиторами протеинкиназ [68].

Очевидно, что по мере изучения механизмов генеза вторичных опухолей число мутаций и нарушений сигнальных путей, вызываемых препаратами этого типа, будет расти.

Распознавание канцерогенных цитостатиков в эксперименте и минимизация канцерогенного риска

В настоящее время распознавание канцерогенных свойств новых цитостатиков и оценка риска развития вторичных опухолей вышли на новый уровень из-за возможности моделирования генетических вариантов, связанных у человека с чувствительностью к канцерогенам. Это в перспективе позволяет индивидуализировать канцерогенный риск химиотерапии. Например, мыши с нокаутом транскрипционного фактора EGR1, регулирующего экспрессию TP53, PTEN, CDKN1A, TGF- β и, соответственно, пролиферацию и апоптоз, обладают высокой чувствительностью к генотоксическим агентам, которые вызывают у них миелолейкоз. Эта линия (Egr1 $^{-/-}$) может быть использована для изучения риска возникновения ОЛМЛ при применении новых химиопрепаратов у наиболее чувствительной части человеческой популяции, поскольку делеция длинного плеча хромосомы 5, в которой локализован EGR, наблюдается у 10 % больных первичным острым миелобластным лейкозом и у 40 % — вторичным [69].

Аналогичной моделью считаются мыши, трансфицированные химерным геном RUNX1/ETO. Этот ген, обнаруживаемый в 12–15 % случаев острого миелолейкоза у человека и являющийся продуктом транслокации t(8;21)(q22;q22), ингибирует созревание гранулоцитов на уровне предшественников клеток миелоидного ряда. Существенно, что без дополнительного генотоксического воздействия лейкоз у этих мышей не возникает [70].

Таким же свойством обладает линия мышей, трансфицированных химерным геном Cbfb-MYH11, образующимся у человека при инверсии или транслокации хромосомы 16 inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22). В результате этой aberrации нарушается функция транскрипционного фактора Cbfb и также ингибируется дифференцировка клеток миелоидного ряда [71].

Количество подобных линий не исчерпывается приведенными и продолжает расти. Что касается возможности предотвращения появления лекарственных

опухолей при сохранении терапевтической активности комбинации препаратов, то здесь поучителен эксперимент 1980-х годов, в котором был разработан щадящий протокол, минимизировавший вторичный канцерогенез. Рутинно использовавшийся в то время в клинической практике протокол CMF включал циклофосфамид (С), метотрексат (М) и 5-фторурацил (F). Поскольку канцерогенные свойства циклофосфамида были уже известны, встал вопрос о риске развития вторичных опухолей у излеченных больных. Эпидемиологические данные на тот момент отсутствовали, поскольку длительность применения протокола не была достаточной. Ситуацию смоделировали в эксперименте на крысах, получивших комбинацию CMF и находившихся под наблюдением до конца жизни. По сравнению с контролем, в подопытных группах было выявлено резкое увеличение частоты опухолей мозга, мочевого пузыря, надпочечников и системы кроветворения. Это предсказало канцерогенную опасность комбинации CMF, которая проявилась десятилетия спустя в клинической практике. В последующих экспериментах на крысах с опухолями молочных желез была найдена комбинация препаратов VMF (винкристин, метотрексат, 5-фторурацил), которая при одинаковой терапевтической эффективности с CMF не вызывала возникновения вторичных опухолей [72, 73].

По данным экспериментов, также было предложено сменить протокол MOPP (мехлоретамин, винкристин, прокарбазин, преднизолон), применявшийся в 1971–1984 гг., на более щадящий ABVD (адриамицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин). Полученные в дальнейшем эпидемиологические данные показали, что при равном лечебном эффекте протокол MOPP чаще вызывал у больных развитие ОЛМЛ, в отличие от пришедшей ему на смену в середине 1980-х годов схемы ABVD (рис. 3).

Помимо разработки комбинаций цитостатиков с низким канцерогенным потенциалом, большое значение имеют дозы препаратов, которые следует подбирать в соответствии с индивидуальными особенностями

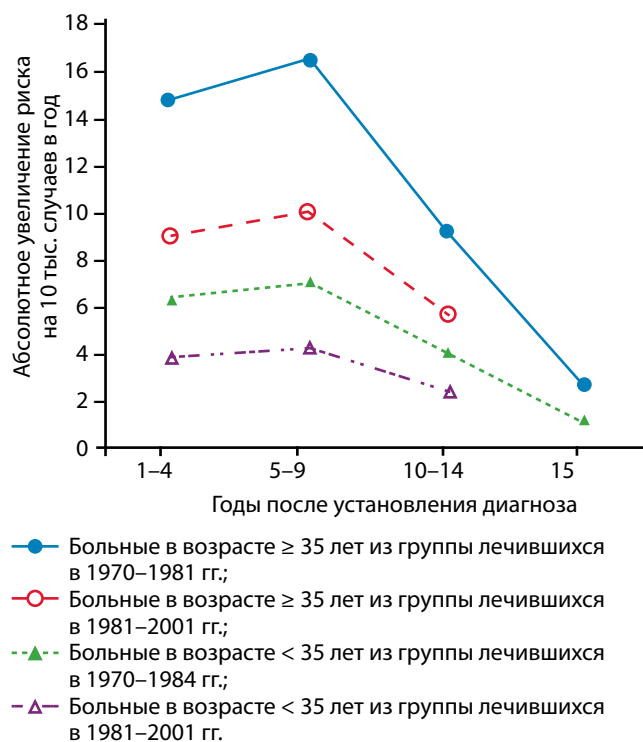


Рис. 3. Изменение риска развития острых лекарственных миелолейкозов в зависимости от совершенствования протоколов химиотерапии первичных опухолей (адаптировано из [74])

стями пациентов. Врожденный полиморфизм систем метаболизма ксенобиотиков или репарации поврежденный ДНК имеется как в нормальных, так и в возникших из их предшественников опухолевых клетках. При этом чувствительность к действию цитостатиков будет повышена у обоих типов клеток, так как маловероятно, чтобы в клетках опухоли произошла обратная мутация, нормализующая процессы метаболизма или репарации. Очевидно, что у такого рода больных сравнимое по эффективности лечебное действие могут оказывать дозы препарата меньшие, чем у пациентов без этого дефекта, и соответственно менее опасные в плане возникновения вторичных опухолей, чем стандартные высокие.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Travis L.B., Demark Wahnefried W., Allan J.M. et al. Aetiology, genetics and prevention of secondary neoplasms in adult cancer survivors. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(5):289–301.
2. Friis S., Kesminiene A., Espina C. et al. European Code against Cancer 4th Edn.: Medical exposures, including hormone therapy, and cancer. *Cancer Epidemiology* 2015;39(Suppl 1):S107–19.
3. Pedersen-Bjergaard J., Pedersen M., Roulston D., Philip P. Different genetic pathways in leukemogenesis for patients

- presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 1995;86(9):3542–52.
4. Савченко В.Г. Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых, 2014. Доступно по: <http://blood.ru/documents/clinical%20guidelines/21.%20klinicheskie-rekomendacii-2014-oml.pdf>. [Savchenko V.G. Parovichnikova E.N., Afanas'ev B.V. et al. Clinical

- recommendations for the diagnostics and treatment of acute myeloid leucosis at adults, 2014. Available at: <http://blood.ru/documents/clinical%20guidelines/21.%20klinicheskie-rekomendacii-2014-oml.pdf>. (In Russ.)]
5. Jerez A., Sugimoto Y., Makishima H. et al. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* 2012;119(25):6109–17.
6. Yang X.H., Wang B., Cunningham J.M. Identification of epigenetic modifications that contribute to pathogenesis in therapy-related

- AML: effective integration of genome-wide histone modification with transcriptional profiles. *BMC Medical Genomics* 2015;8(Suppl 2):1–13.
7. Salas C., Pérez-Vera P., Frías S. Genetic abnormalities in leukemia secondary to treatment in patients with Hodgkin's disease. *Rev Invest Clin* 2011;63(1):53–63.
8. Walter M.J., Shen D., Ding L. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1090–8.
9. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2001. [Volkova M.A. Clinical oncohematology. Moscow: Meditsina, 2001. (In Russ.)].
10. Huitema A.D., Smits K.D., Mathôt R.A. et al. The clinical pharmacology of alkylating agents in high-dose chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2000;11(7):515–33.
11. Johnson L.A., Malayappan B., Tretyakova N. et al. Formation of cyclophosphamide specific DNA adducts in hematological diseases. *Pediatr Blood Cancer* 2012;58(5):708–14.
12. Allan J.M., Wild C.P., Rollinson S. et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(20):11592–7.
13. Minev B. Cancer management in man: chemotherapy, biological therapy, hyperthermia and supporting measures. New York: Springer, 2011.
14. Mathijssen R.H., van Alphen R.J., Verweij J. et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001;7(8):2182–94.
15. Minami H., Sai K., Saeki M. et al. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1*6 and *28. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17(7):497–504.
16. Toffoli G., Cecchin E., Corona G. et al. The role of UGT1A1*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(19):3061–8.
17. Fujita K., Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan disposition and toxicity: a review. *Curr Clin Pharmacol* 2010;5(3):209–17.
18. Zhuo X., Zheng N., Felix C.A., Blair I.A. Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. *Drug Metab Dispos* 2004;32(9):993–1000.
19. Kishi S., Yang W., Boureau B. et al. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2004;103(1):67–72.
20. Fan Y., Schreiber E.M., Giorgianni A. et al. Myeloperoxidase-catalyzed metabolism of etoposide to its quinone and glutathione adduct forms in HL60 cells. *Chem Res Toxicol* 2006;19(7):937–43.
21. Lovett B.D., Strumberg D., Blair I.A. et al. Etoposide metabolites enhance DNA topoisomerase II cleavage near leukemia-associated MLL translocation breakpoints. *Biochemistry* 2001;40(5):1159–70.
22. Felix C.A., Walker A.H., Lange B.J. et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(22):13176–81.
23. Westlind A., Löfberg L., Tindberg N., et al. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(1):201–5.
24. Spurdle A.B., Goodwin B., Hodgson E. et al. The CYP3A4*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 2002;12(5):355–66.
25. Collado M., Barragan E., Bolufer P. et al. Lack of association of CYP3A4-V polymorphism with the risk of treatment-related leukemia. *Leuk Res* 2005;29(5):595–7.
26. Rund D., Krichevsky S., Bar-Cohen S. et al. Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia* 2005;19(11):1919–28.
27. Larson R.A., Wang Y., Banerjee M. et al. Prevalence of the inactivating 609C>T polymorphism in the NAD (P) H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:803–7.
28. Mochida Y., Taguchi K., Taniguchi S. et al. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of *mdr1a* suppresses polyp formation in *Apc^{Min/+}* mice. *Carcinogenesis* 2003;24(7):1219–24.
29. Rund D., Krichevsky S., Bar-Cohen S. et al. Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia* 2005;19(11):1919–28.
30. Hitzl M., Drescher S., van der Kuip H. et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11(4):293–8.
31. Sill H., Olipitz W., Zebisch A. et al. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *Br J Pharmacol* 2011;162(4):792–805.
32. Burden D.A., Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400(1–3):139–54.
33. Park S.Y., Lam W., Cheng Y.C. X-ray repair cross-complementing gene I protein plays an important role in camptothecin resistance. *Cancer Res* 2002;62(2):459–65.
34. Kutschera E., Sauermaun-Ruge I. Late results of cataract surgery after ocular prosthesis. *Klin Monbl Augenheilkd* 1975;167(4):550–4.
35. Han J.Y., Lee G.K., Yoo S.Y. et al. Association of SUMO1 and UBC9 genotypes with tumor response in non-small-cell lung cancer treated with irinotecan-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2010;10(2):86–93.
36. Link D.C., Schuettelpelz L.G., Shen D. et al. Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML. *JAMA* 2011;305(15):1568–76.
37. Kleinerman R.A., Tucker M.A., Tarone R.E. et al. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. *J Clin Oncol* 2005;23(10):2272–9.
38. Sharif S., Ferner R., Birch J.M. et al. Second primary tumors in neurofibromatosis 1 patients treated for optic glioma: substantial risks after radiotherapy. *J Clin Oncol* 2006;24(16):2570–5.
39. Goldstein A.M., Yuen J., Tucker M.A. Second cancers after medulloblastoma: population-based results from the United States and Sweden. *Cancer Causes Control* 1997;8(6):865–71.
40. Breslow N.E., Lange J.M., Friedman D.L. et al. Secondary malignant neoplasms after Wilms tumor: an international collaborative study. *Int J Cancer* 2010;127(3):657–66.
41. Rai R., Peng G., Li K., Lin S.Y. DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. *Cancer Genomics Proteomics* 2007;4(2):99–106.
42. Berwick M., Begg C.B., Armstrong B.K. et al. Interaction of CDKN2A and sun exposure in the etiology of melanoma in the general population. *J Invest Dermatol* 2011;131(12):2500–3.
43. Seedhouse C., Faulkner R., Ashraf N. et al. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10(8):2675–80.
44. Jawad M., Seedhouse C.H., Russell N., Plumb M. Polymorphisms in human homeobox *HLX1* and DNA repair *RAD51* genes increase the risk of therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;108(12):3916–8.
45. Best T., Li D., Skol A.D. et al. Variants at 6q21 implicate *PRDM1* in the etiology of therapy-induced second malignancies after Hodgkin's lymphoma. *Nat Med* 2011;17(8):941–3.
46. Allan J.M., Smith A.G., Wheatley K. et al. Genetic variation in *XPD* predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood* 2004;104(13):3872–7.
47. Ellis N.A., Huo D., Yildiz O. et al. *MDM2* SNP309 and *TP53* Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility. *Blood* 2008;112(3):741–9.
48. Worrillow L.J., Smith A.G., Scott K. et al. Polymorphic *MLH1* and risk of cancer after

- methylating chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *J Med Genet* 2008;45(3):142–6.
49. Seedhouse C., Bainton R., Lewis M. et al. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2002;100(10):3761–6.
50. Guillem V.M., Collado M., Terol M.J. et al. Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia* 2007;21(7):1413–22.
51. Bhatia S. Genetic variation as a modifier of association between therapeutic exposure and subsequent malignant neoplasms in cancer survivor. *Cancer* 2015;121(5):648–63.
52. Best T., Li D., Skol A.D. et al. Variants at 6q21 implicate PRDM1 in the etiology of therapy-induced second malignancies after Hodgkin's lymphoma. *Nature Medicine* 2011;17(8):941–3.
53. Bernstein J.L., Haile R.W., Stovall M. et al. Radiation exposure, the ATM gene, and contralateral breast cancer in the women's environmental cancer and radiation epidemiology study. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(7):475–83.
54. Li C.I., Daling J.R., Porter P.L. et al. Adjuvant hormonal therapy for breast cancer and risk of hormone receptor-specific subtypes of contralateral breast cancer. *Cancer Res* 2009;69(17):6865–70.
55. ARC Monographs series on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some pharmaceutical drugs. Lyon, 1996;66:253–388.
56. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. СПб., 2000. [Berstejn L.M. Hormonal cancerogenesis. Saint Petersburg, 2000. (In Russ.)].
57. Krishnan B., Morgan G.J. Non-Hodgkin lymphoma secondary to cancer chemotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(3):377–80.
58. WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives. Depot-medroxy-progesterone acetate(DMPA) and risk of endometrial cancer. *Int J Cancer* 1991;49(2):186–90.
59. Concannon P.W., Spraker T.R., Casey H.W., Hansel W. Gross and histopathologic effects of medroxy-progesterone acetate and progesterone on the mammary glands of adult beagle bitches. *Fertil Steril* 1981;36(3):373–87.
60. Kasi P.M., Tawbi H.A., Oddis C.V., Kulkarni H.S. Clinical review: serious adverse events associated with the use of rituximab – a critical care perspective. *Critical Care* 2012;16(4):231.
61. Yang B., Lu X.C., Yu R.L. et al. Diagnosis and treatment of rituximab-induced acute tumor lysis syndrome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Med Sci* 2012;343(4):337–41.
62. Tarella C., Passera R., Magni M. et al. Risk factors for the development of secondary malignancy after high-dose chemotherapy and autograft, with or without rituximab: a 20-year retrospective follow-up study in patients with lymphoma. *J Clin Oncol* 2011;29(7):814–24.
63. Li Q., Teitz-Tennenbaum S., Donald E.J. et al. *In vivo* sensitized and *in vitro* activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2009;183(5):3195–203.
64. Baldo B.A. Adverse events to monoclonal antibodies used for cancer therapy: focus on hypersensitivity responses. *OncoImmunology* 2013;2(10):e26333.
65. Abdulghani J., El-Deiry W.S. TRAIL receptor signaling and therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(10):1091–108.
66. Soria J.C., Smit E., Khayat D. Phase 1b study of dulanermin (recombinant humanApo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(9):1527–33.
67. Miles M.A., Shekhar T.M., Hall N.E., Hawkins C.J. TRAIL causes deletions at the HPRT and TK1 loci of clonogenically competent cells. *Mutat Res* 2016;787:15–31.
68. Ko J.C., Hong J.H., Wang L.H. et al. The role of repair protein Rad51 in synergistic cytotoxicity and mutagenicity induced by epidermal growth factor receptor inhibitor (Gefitinib, IressaR) and benzo[a]pyrene in human lung cancer. *Exp Cell Res* 2008;314(8):1881–91.
69. Baron V., Adamson E.D., Calogero A. et al. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther* 2006;13(2):115–24.
70. Westendorf J.J., Yamamoto C.M., Lenny N. et al. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 1998;18(1):322–33.
71. Castilla L.H., Garrett L., Adya N. et al. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 1999;23(2):144–6.
72. Berger M., Habs M., Schmähl D. Noncarcinogenic chemotherapy with combination of vincristine, metotrexate and 5-fluorouracil(VMF) in rats. *Int J Cancer* 1983;32(2):231–6.
73. Some antineoplastic and immunosuppressive agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 1981;26:1–411.
74. Schonfeld S.J., Gilbert E.S., Dores G.M. et al. Acute myeloid leukemia following Hodgkin lymphoma: a population-based study of 35,511 patients. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(3):215–8.

Морфологическая классификация нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы: современное состояние проблемы и нерешенные вопросы

В.В. Делекторская

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Вера Владимировна Делекторская delektorskaya@yandex.ru

Нейроэндокринные опухоли образуют разнородную группу злокачественных эпителиальных новообразований, диагностика которых основывается на особенностях гистологической структуры и иммуногистохимического профиля. В классификации Всемирной организации здравоохранения (2010) для нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы были определены основные категории, номенклатура, критерии градации и стадирования. При этом накопленные данные демонстрируют ряд важных патоморфологических противоречий в подходе к классификации. В данном обзоре мы остановимся на некоторых общих особенностях нейроэндокринных новообразований, их классификации, морфологических и биологических различиях основных категорий, наиболее важных иммуногистохимических маркерах.

Ключевые слова: нейроэндокринная опухоль, желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа, морфология, иммуногистохимические маркеры, степень злокачественности, стадия

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-56–66

Morphological classification of digestive neuroendocrine neoplasms: the current concepts and controversies

V.V. Delektorskaya

N.N. Blokhin Russian Cancer Reseach Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Neuroendocrine tumors comprise the heterogeneous group of malignant epithelial neoplasms, the diagnosis of which is based on their histopathologic features and immunohistochemical profile. For neuroendocrine tumors of the digestive system in the World Health Organization (2010) classification were introduced main categories, the nomenclature, criteria for grading and staging. However, accumulating evidence demonstrates actual controversies in the histopathology of neuroendocrine neoplasms and unreserved problems in their classification. In this review we focus on some of the common features of neuroendocrine neoplasms, their classification, and differences in pathology, biology of the main categories, and the most important immunohistochemical markers.

Key words: neuroendocrine tumor, gastrointestinal tract, pancreas, pathology, immunohistochemical markers, grade, stage

Введение

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой гетерогенную группу относительно редких эпителиальных злокачественных новообразований, которые развиваются из нейроэндокринных клеток, расположенных в различных органах и обладающих общей способностью синтезировать биологически активные вещества и пептидные гормоны. НЭО желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и поджелудочной железы (ПЖ) образуют наиболее распространенную группу опухолей данного типа и составляют более 60 % нейроэндокринных новообразований (НЭН) всех анатомических локализаций, при этом частота их развития и распространенность значительно увеличиваются в последние десятилетия во всем мире [1–4].

Несмотря на сходную биологию и морфологические особенности, НЭН пищеварительной системы — крайне разнородная группа в отношении клинических

проявлений, что требует разработки четких критериев для их классификации [5–8].

Номенклатура и гистологическая классификация

Термин «карциноид» предложен Всемирной организацией здравоохранения (World Health Organization, WHO) в 1980 г. для описания всех гастроинтестинальных НЭО, демонстрирующих, как предполагалось, доброкачественное поведение, и в течение нескольких десятилетий использовался для их диагностики без учета разнородности новообразований. Исключение составляли островково-клеточные опухоли ПЖ и мелко-клеточный рак.

В классификацию НЭО, разработанную WHO в 2000 г., впервые были введены термины «эндокринная опухоль» и «эндокринный рак» (НЭР) для стратификации устаревшего термина «карциноид» на различные прогностические группы [9]. Главная концепция

данной классификации заключается в выделении доброкачественных НЭО, НЭО с неопределенным биологическим поведением и злокачественных нейроэндокринных карцином. Оценка злокачественности была основана на морфологических параметрах (ангиоинвазии) и наличии метастазов. Однако практическое использование этой системы было ограничено необходимостью комбинировать критерии стадирования и градации при диагностике НЭО с неопределенным биологическим поведением [10–12].

Важные изменения в классификацию НЭО ЖКТ и ПЖ были внесены WHO в 2010 г. Была введена концепция последовательного определения типа, степени злокачественности (Grade, G), а затем стадии опухоли по аналогии с другими злокачественными новообразованиями [13, 14]. Длительные клинические наблюдения показали, что НЭО являются злокачественной категорией, при этом показатели гистологической градации и стадия достоверно и независимо друг от друга коррелируют с выживаемостью больных. Данная концепция позволила выделить группы риска в рамках злокачественного заболевания и провести их классификацию с учетом прогноза заболевания [15–17].

Важным является то, что определение степени злокачественности и стадии независимо от номенклатуры дало возможность морфологу даже при анализе материала биопсий установить диагноз НЭО и определить категорию новообразования.

В классификации WHO (2010) также было введено более четкое разграничение между высокодифференцированными НЭО (G_1 и G_2) и низкодифференцированным нейроэндокринным раком (НЭР) (G_3). Такое разделение подчеркивает фундаментально различные биологические особенности, механизмы канцерогенеза и подходы к лечению этих 2 семейств НЭН. В частности, последние исследования показывают, что высокодифференцированные НЭО имеют специфические для конкретного органа генетические нарушения, например мутации генов *MEN1*, *DAXX*, *ATRX*, *TSC*, *NFI* в НЭО ПЖ [18], при этом низкодифференцированный НЭР демонстрирует мутации, общие с неэндокринными карциномами того же органа, в сочетании с характерными для любой локализации мутациями гена *TP53* или *RB* [19].

Термин «карциноид», который был ранее отменен (WHO, 2000) и употреблялся только в контексте карциноидного синдрома, в классификации WHO (2010) применяется в отношении всех высокодифференцированных НЭО ЖКТ, имеющих низкую степень злокачественности (НЭО, G_1). Для обозначения всей группы опухолей независимо от степени дифференцировки и злокачественности предложен термин «нейроэндокринные неоплазии/новообразования». Комбинированные опухоли обозначают как смешанный адено-НЭР.

В табл. 1 представлены основные категории НЭН ЖКТ и ПЖ с учетом дифференцировки и степени злокачественности.

Таблица 1. Классификация нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы (WHO, 2010)

Дифференцировка	Степень злокачественности (G)	Категория
Высокодифференцированные	Низкая (G_1)	НЭО, G_1 (карциноид)
	Промежуточная (G_2)	НЭО, G_2
Низкодифференцированные	Высокая (G_3)	НЭР, G_3 Мелкоклеточный тип Крупноклеточный тип
Комбинированные	Высокая (G_3)	Смешанный адено-НЭР (аденокарцинома и мелкоклеточный рак)
		Смешанный адено-НЭР (аденокарцинома и крупноклеточный НЭР)

Примечание. НЭО – нейроэндокринные опухоли; НЭР – нейроэндокринный рак.

Отдельные специфичные по локализациям классификации НЭО пищеварительной системы (WHO, 2010) отражают анатомические и функциональные особенности конкретного органа (пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, подвздошной кишки, червеобразного отростка, толстой кишки, ПЖ). Важно помнить, что место развития определяет целый ряд биологических особенностей НЭО, при этом одни и те же типы новообразований могут иметь разный прогноз течения заболевания в зависимости от их конкретной первичной анатомической локализации [20].

Хотя большинство НЭО ЖКТ и ПЖ является клинически нефункционирующими, некоторые новообразования демонстрируют избыточную продукцию одного или нескольких биологически активных гормонов, что вызывает определенные паранеопластические синдромы, такие как карциноидный синдром, синдром Кушинга, синдром Золлингера–Эллисона [21]. Среди функционирующих опухолей преобладают НЭО ПЖ, при этом чаще встречаются такие типы, как инсулинома и гастринома. К редким разновидностям относятся VIPома, глюкагонома, соматостатинома, опухоль из PP-клеток. Отдельные типы функционирующих опухолей имеют характерный прогноз, например низкий злокачественный потенциал характерен для большинства панкреатических инсулином [22]. Хотя важно дать морфологическую характеристику функционирующей НЭО, включая демонстрацию иммуногистохимической (ИГХ) продукции гормонов, определение ее конкретного типа требует наличия соответствующего клинического синдрома. Нефункционирующие опухоли ПЖ обычно обнаруживают на более поздних стадиях. Несмотря на отсутствие клинических симптомов гормональной гиперсекреции, эти опухоли иногда демонстрируют ИГХ-экспрессию различных гормонов.

Высокодифференцированные НЭО ЖКТ и ПЖ также могут быть одним из проявлений наследственного синдрома множественной эндокринной неоплазии 1-го типа (MEN-1), синдрома фон Гиппеля–Линдау, нейрофиброматоза 1-го типа (NF-1) и туберозного склероза [23].

Морфологические особенности нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы

Основой морфологической диагностики НЭН являются оценка особенностей гистологической структуры опухоли и ИГХ-демонстрация нейроэндокринного фенотипа опухолевых клеток.

Важно отметить, что морфологическую диагностику следует проводить с учетом клинической информации (возраст, пол пациента, анамнез, особенности клинического течения, данные лабораторных и инструментальных методов исследования).

Морфологическая диагностика позволяет в первую очередь разделить НЭН на высокодифференцированные НЭО и низкодифференцированный НЭР на основе гистологических особенностей и выраженности клеточной пролиферации [24].

Высокодифференцированные НЭО (G_1 и G_2) состоят из небольших мономорфных опухолевых клеток и представляют собой типичную хорошо организованную гистологическую структуру: органоидную модель строения с тонкой фиброваскулярной стромой, разграничивающей гнезда опухолевых клеток, которые иногда формируют цепочки, структуры типа периферических «палисадов» и «розеток» (рис. 1а). Характерной чертой является вид ядер с незаметными ядрышками и особой конфигурацией хроматина, представленного смесью крупно- и мелкогранулярного компонентов, которые часто обозначают как «соль и перец» (“salt & pepper”).

В то время как цитологические и ядерные характеристики высокодифференцированных НЭО одно-

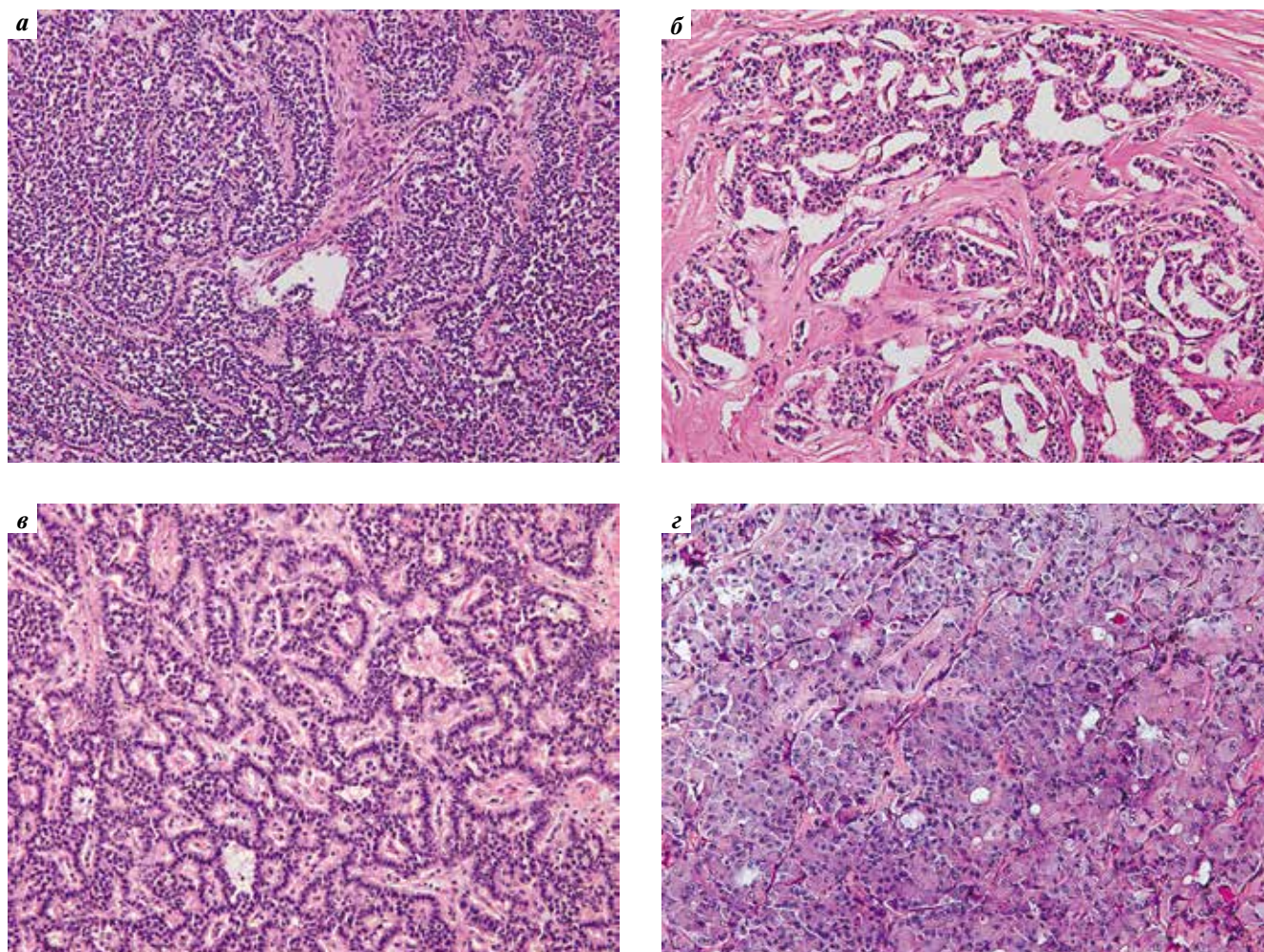


Рис. 1. Гистологические особенности высокодифференцированных нейроэндокринных опухолей (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$): а – подвздошной кишки G_1 (гнездная структура из мелких клеток, формирующих периферические «палисады»); б – поджелудочной железы G_2 (альвеолярная и псевдогландулярная модель строения); в – поджелудочной железы G_1 (трабекулярное строение из однотипных клеток, формирующих анастомозирующие цепочки); г – поджелудочной железы G_2 (демонстрирует онкоцитарную морфологию и состоит из крупных клеток с широкой розовой зернистой цитоплазмой)

типны и постоянны, модели их роста демонстрируют значительное морфологическое разнообразие. Помимо типичных инсулярной, ацинарной или трабекулярной форм роста (рис. 1б, в) могут встречаться веретенклеточный, папиллярный, онкоцитарный, светлоклеточный, плеоморфный, рабдоидный, муцин-секретирующий, пигментный (меланин-секретирующий), с образованием в строме хряща, кости, гиалина, амилоида и другие варианты морфологии (рис. 1г).

Категория *низкодифференцированного НЭР (G₃)* объединяет высокозлокачественные новообразования, которые демонстрируют нейроэндокринную дифференцировку, но отличаются от высокодифференцированных аналогов морфологией, клиническим поведением и генетическими нарушениями [25, 26]. Эти новообразования подразделяются на мелко- и крупноклеточные типы, которые различают в соответствии с размером клеток и специфической ядерной морфологией. Порогом для разграничения по размеру клеток

является диаметр 3 лимфоцитов, хотя в повседневной практике эти различия могут быть условными.

Мелкоклеточный рак состоит из однотипных клеток небольшого размера, округлой или вытянутой формы со скудной цитоплазмой и нечеткими клеточными границами (рис. 2а). Ключевой диагностический признак — вид ядер, содержащих характерный «нежный», часто зернистый («salt & pepper») хроматин и незаметные ядрышки. Слабое развитие цитоплазмы (в виде узкого ободка) создает вид опухоли из «голых» ядер, которые лежат в тесном соседстве друг с другом, часто повторяя форму прилегающих поверхностей («nuclear moulding»). Преобладающая модель роста — сливающиеся солидные пласты опухолевых клеток, нередко ориентированные в одном направлении. Зоны диффузного роста опухоли иногда могут сочетаться с типичными карциноидными структурами и наличием «розеток». Для опухоли характерны некрозы отдельных клеток в сочетании с обширными географическими

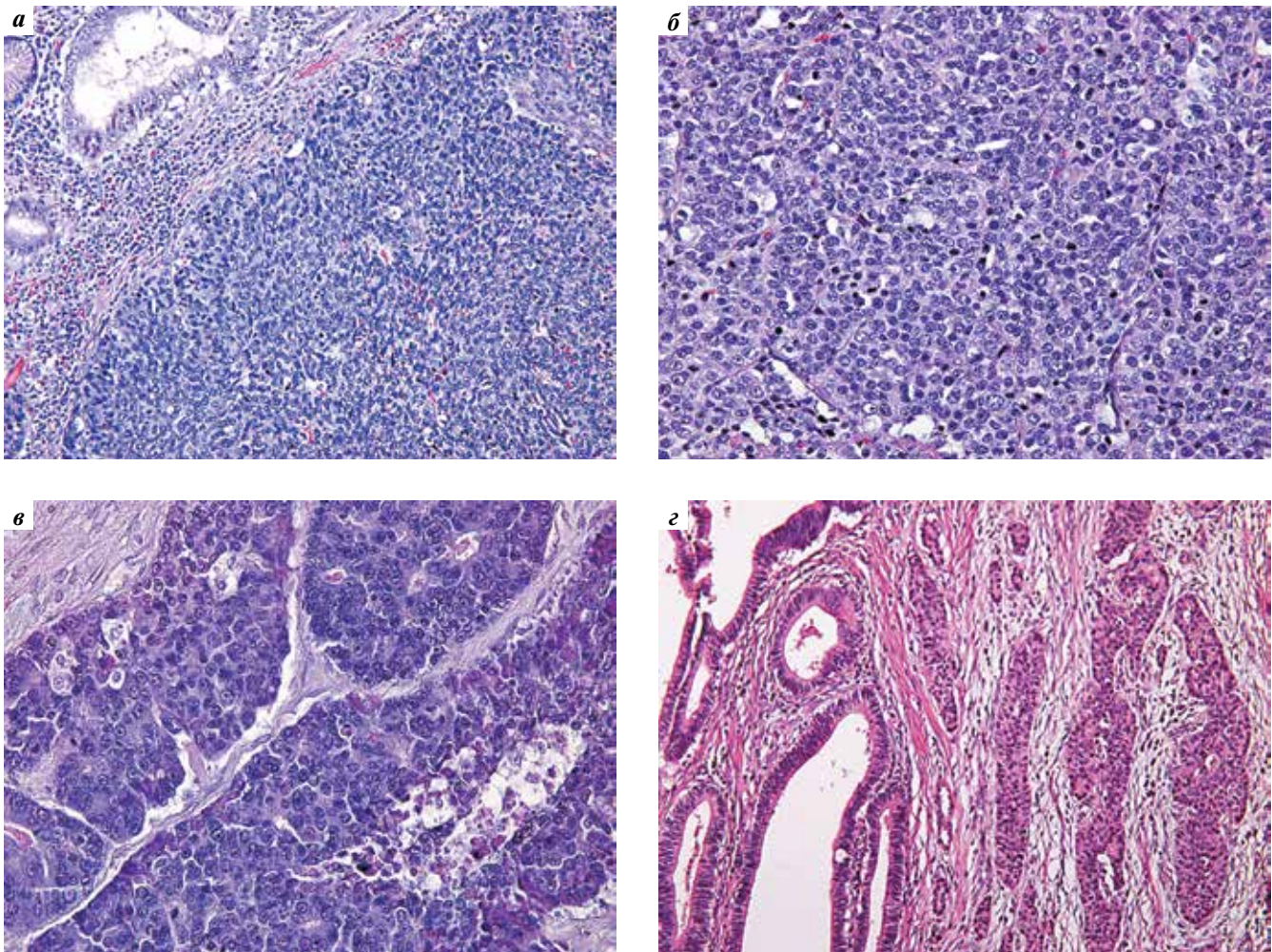


Рис. 2. Гистологические особенности низкодифференцированного нейроэндокринного рака (окраска гематоксилином и эозином): а — нейроэндокринный рак желудка, мелкоклеточный тип ($\times 200$); б — мелкоклеточный рак желудка (округлые клетки с гиперхромными ядрами и высокой митотической активностью, $\times 400$); в — нейроэндокринный рак поджелудочной железы, крупноклеточный тип (клетки опухоли содержат полиморфные ядра с ядрышками, видны участки некроза, $\times 400$); г — смешанный аденонейроэндокринный рак желудка (опухоль представлена умеренно дифференцированной аденокарциномой кишечного типа (левая часть) и крупноклеточным нейроэндокринным раком (правая часть), $\times 200$)

некрозами. С учетом высокой пролиферативной активности клеток опухоли легко обнаруживаются митозы, которые часто смешаны с апоптотическими тельцами (рис. 2б). Морфологический диагноз базируется преимущественно на оценке гистологических особенностей опухоли, выявляемых на светооптическом уровне при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Крупноклеточный НЭР состоит из клеток крупного/промежуточного размера с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, значительной ядерной атипией, большим числом митозов (рис. 2в). Ядра часто содержат просветленный, везикулярный или «комковатый» хроматин, не имеющий «salt & pepper»-подобного вида. Могут определяться четкие ядрышки. Опухоль часто сохраняет нейроэндокринную морфологию. Характер роста преимущественно солидный, с образованием неровных гнездовых структур с участками больших центральных некрозов и периферическими палисадами. Опухолевые клетки содержат более выраженный ободок цитоплазмы по сравнению с мелкоклеточным раком, при этом клетки очень плеоморфны и гиперхромны, что делает дифференциальный диагноз с недифференцированным раком (или с низкодифференцированным раком экзокринного типа) трудным или невозможным без ИГХ-исследования. Для подтверждения диагноза крупноклеточного НЭР необходимо продемонстрировать положительную экспрессию как минимум 1 нейроэндокринного маркера.

В смешанных адено-НЭН нейроэндокринный компонент может быть представлен как крупноклеточным, так и мелкоклеточным раком (рис. 2г).

Иммуногистохимические особенности

ИГХ-анализ позволяет подтвердить нейроэндокринную природу опухоли, различить отдельные подтипы НЭО, уточнить гормональный статус, а также определить место развития первичной опухоли при исследовании метастазов без выявленного первичного очага [27].

Для подтверждения диагноза НЭО необходимы 2 основных общих нейроэндокринных маркера: хромогранин А — один из наиболее специфичных маркеров, который окрашивает компоненты нейросекреторных гранул (рис. 3а, б), и синаптофизин — наиболее чувствительный маркер, выявляющий мелкие синаптические везикулы (рис. 3в, г). Экспрессия хромогранина А может быть снижена или совсем отсутствовать в низкодифференцированных НЭН, при этом наличие синаптофизина обязательно для постановки диагноза. С другой стороны, следует с осторожностью оценивать исключительно синаптофизин-положительные случаи, так как опухоли, морфологически схожие с НЭО, такие как ацинарно-клеточный рак и солидная псевдопапиллярная опухоль ПЖ, могут быть фокально положительны к синаптофизину.

Мембранный рецептор молекул нейроадгезии CD56, а также маркеры цитоплазматических протеинов NSE

и PGP9.5 обладают высокой чувствительностью, но должны применяться с осторожностью из-за их низкой специфичности.

Для подтверждения эпителиальной природы опухоли используют ИГХ-выявление кератинов, которое особенно важно в сложных диагностических случаях для верификации диагноза низкодифференцированных НЭН. Большинство НЭО при ИГХ-исследовании демонстрирует положительную экспрессию панцитокератина (AE1/AE3) и низкомолекулярных цитокератинов (CK8, CK18, CAM 5.2) (рис. 3д). Для низкодифференцированных опухолей, особенно мелкоклеточного рака, типичным является слабое точечное («dot-like») окрашивание на цитокератины, которое отличается от сильной диффузной реакции, характеризующей высокодифференцированные НЭО.

При исследовании метастазов высокодифференцированных НЭО без выявленного первичного очага в диагностических целях используют транскрипционные факторы CDX-2 (caudal type homeobox transcription factor 2) и TTF-1 (thyroid transcription factor 1) [28, 29]. С помощью этих белков можно различить наиболее частые первоисточники метастатических опухолей, к которым относятся органы ЖКТ, ПЖ и легкое. Следует помнить, что при низкодифференцированных НЭН экспрессия транскрипционных факторов наблюдается независимо от первичной локализации опухоли.

Среди диагностических маркеров, которые дают возможность дифференцировать первичные опухоли органов ЖКТ и ПЖ, наиболее активно изучают PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox factor 1), ISL-1 (Islet 1) и PAX-8 (paired boxes-8), хотя специфичность данных факторов требует уточнения [30–34]. ИГХ-верификация отдельных пептидных гормонов, характеризующих специфический тип секреции клеток, также может оказаться полезной для определения первоисточника опухоли. Новые специфичные для конкретных локализаций ИГХ-маркеры (NRX6-1, CD24) постоянно дополняют диагностическую панель НЭО [35, 36]

Антиген Ki-67 (клон MIB-1), который обнаруживается в ядрах опухолевых клеток при ИГХ-исследовании (рис. 3е), является ключевым фактором, утвержденным классификацией WHO (2010), для определения пролиферативной активности и степени злокачественности НЭО ЖКТ и ПЖ [37].

Таким образом, оптимальная панель ИГХ-окрасок для практической диагностики НЭН ЖКТ и ПЖ включает хромогранин А, синаптофизин, низкомолекулярные кератины и Ki-67 (клон MIB-1).

Предметом многочисленных работ, направленных на расширение диагностических возможностей ИГХ-исследования НЭО, является поиск молекулярных маркеров, ассоциированных с прогнозом течения и эффективностью лечения данного типа опухолей. Ранее было показано, что положительная ИГХ-экспрессия KIT и CK19 и отрицательная экспрессия рецепторов прогестерона и PTEN ассоциированы с плохим прог-

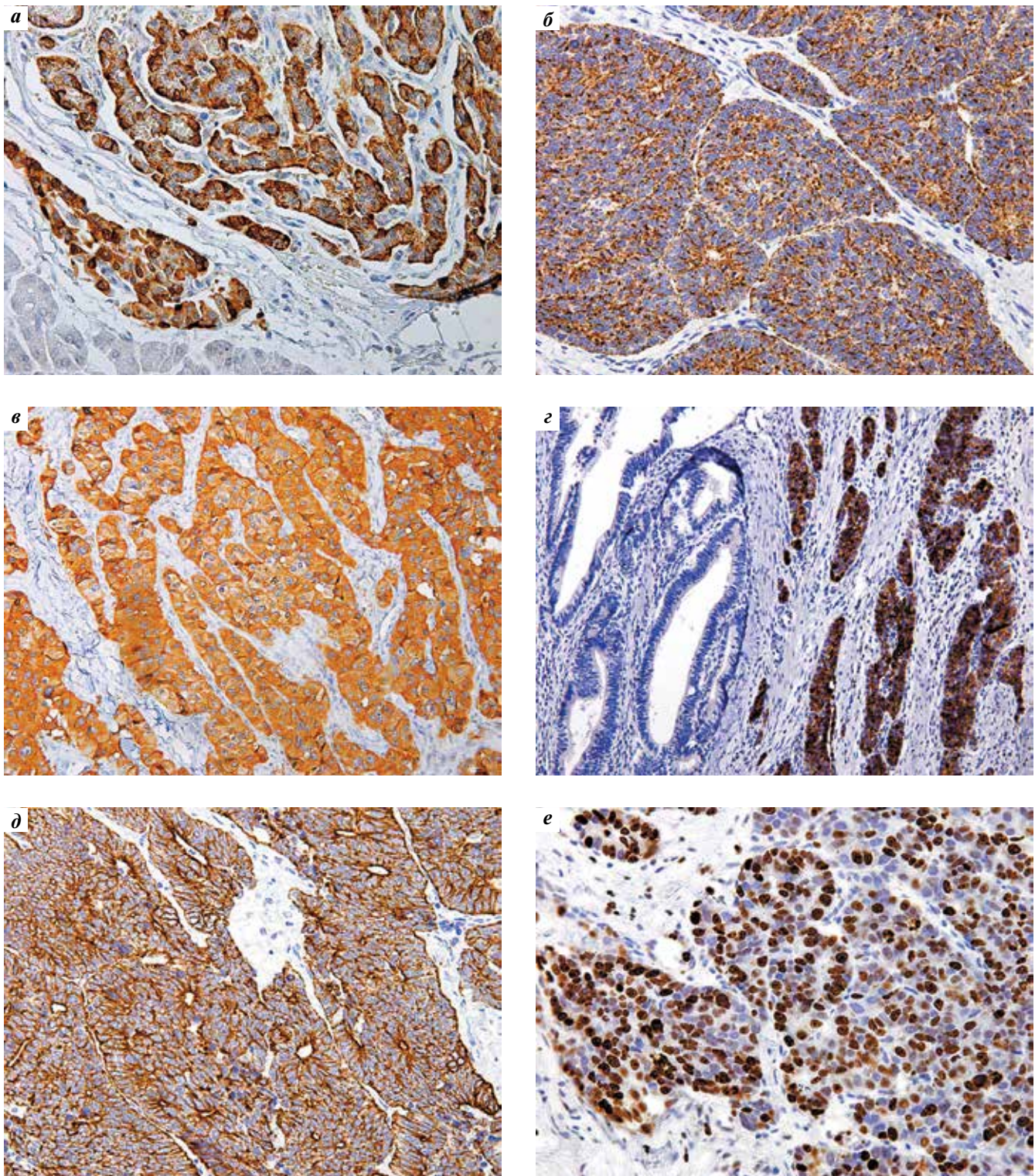


Рис. 3. Иммуногистохимические особенности нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы ($\times 400$): а – диффузная экспрессия хромогранина А в нейроэндокринной опухоли G_1 поджелудочной железы; б – точечная (“dot-like”) экспрессия хромогранина А в метастазе крупноклеточного нейроэндокринного рака желудка в лимфатическом узле; в – экспрессия синаптофизина в нейроэндокринной опухоли G_2 поджелудочной железы; г – экспрессия синаптофизина в нейроэндокринном компоненте смешанного аденонейроэндокринного рака желудка (правая часть); д – экспрессия цитокератина 18 в крупноклеточном нейроэндокринном раке желудка; е – экспрессия Ki-67 в ядрах клеток нейроэндокринного рака толстой кишки (индекс Ki-67 составляет 60 %; ядра клеток докрашены гематоксилином Майера)

нозом НЭО ПЖ, однако эти данные остаются противоречивыми. К перспективным маркерам, характеризующим прогноз и чувствительность НЭО к специфическому

лечению, относятся рецепторы соматостатина (SSTR), 06-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT), молекулы путей сигнальной трансдукции PI3K/pAkt/mTOR

[38–41]. Последние научные работы демонстрируют, что потеря белковой экспрессии DAXX (death-domain associated protein) и ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) связана с плохой выживаемостью больных НЭО ПЖ [42].

Таким образом, тщательный выбор панели маркеров в зависимости от морфологии опухоли обеспечивает правильную диагностику НЭН пищеварительной системы, одним из важных аспектов которой является определение степени злокачественности опухоли.

Степень злокачественности нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы

Градация НЭН пищеварительной системы обеспечивает важную информацию для прогностической стратификации и правильного ведения пациента. Современная система определения степени злокачественности (G_1 , G_2 , G_3) включена в классификацию WHO (2010) и основана на оценке гистологии и пролиферирующей фракции (уровня митотической активности и индекса Ki-67) (табл. 2).

Ключевыми моментами считаются подсчет числа митозов в 50 полях зрения при большом ($\times 400$) увеличении микроскопа (high power fields, HPF) и определение индекса Ki-67 (клон MIB-1) как процента окрашенных ядер опухолевых клеток. Результат выражается как среднее число митозов в 10 HPF и средний процент окрашенных ядер при учете 500–2000 опухолевых клеток [43].

Таблица 2. Система определения степени злокачественности (WHO, 2010)

Степень злокачественности опухоли (G)	Количество митозов $\times 10$ HPF (2 мм ²)	Индекс Ki-67, %
Низкая (G_1)	< 2	≤ 2
Промежуточная (G_2)	2–20	3–20
Высокая (G_3)	> 20	> 20

Примечание. Здесь и в табл. 3: HPF (high power fields) – поле зрения при большом ($\times 400$) увеличении микроскопа.

Точный подсчет числа митозов важен, но не всегда возможен, так как часто трудно отличить истинный митоз от похожих изменений ядер, включающих пикноз, кариорексис и апоптотические тельца. В последнее время для подсчета числа митозов в НЭО применяют новый митоз-специфический маркер – фосфогистон H3 (phosphohistone H3, PHH3). Было показано, что число митозов при подсчете в препаратах, окрашенных с помощью PHH3, а также гематоксилином и эозином, в основном совпадает, однако результаты требуют дальнейшего подтверждения [44].

Определение пролиферативной активности опухолевых клеток с помощью подсчета индекса Ki-67 – необходимое условие современной морфологической диагностики и база для дальнейшей клинической оценки

агрессивности течения заболевания и обоснованного назначения соответствующих режимов лекарственного лечения [45]. Следует подчеркнуть, что оценку индекса Ki-67 необходимо выполнять во всех случаях в зонах наивысшей пролиферативной активности (“hot spots”). В связи с внутриопухолевой гетерогенностью данного параметра и возможным несовпадением митотического индекса и индекса Ki-67 важно оценивать заболевание с учетом наиболее высокого показателя пролиферативной активности опухолевых клеток. Последние исследования показали, что индекс Ki-67 является непостоянным параметром, который может значительно меняться в процессе опухолевой прогрессии, поэтому его определение рекомендуется проводить не только в первичной опухоли, но и в биопсиях метастазов [46–48].

К методам оценки индекса Ki-67 относятся быстрый визуальный подсчет числа окрашенных ядер при микроскопическом исследовании (“eyeball”-оценка), ручной подсчет числа окрашенных и неокрашенных ядер в «горячих точках» на напечатанном изображении и автоматизированный цифровой анализ [49]. Кроме этого, необходимо осуществлять контроль качества оценки данного параметра, чтобы избежать субъективизма и существующие межлабораторные расхождения [50].

В табл. 3 представлены основные характеристики гистологической структуры опухоли и пролиферативной активности клеток, которые позволяют дифференцировать высоко- и низкодифференцированные НЭН.

Прогнозирование течения НЭО в перспективе будет улучшаться на основе совершенствования современной системы градации, разработки более точных пороговых уровней для различных локализаций НЭО и интеграции информации о других прогностических маркерах.

Таким образом, на сегодняшний день использование пороговых уровней Ki-67, составляющих 2 % (G_1 – G_2) и 20 % (G_2 – G_3), дает возможность стратифицировать исход заболевания, причем такое разделение достоверно коррелирует с выживаемостью больных НЭН и не зависит от стадии заболевания.

Стадия нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы

Европейское общество по изучению НЭО (European neuroendocrine tumor society, ENETS) разработало первую систему стадирования, которая базируется на большом объеме достоверных данных и междисциплинарных экспертных оценках [51]. Предложения ENETS легли в основу 7-й редакции Руководства по определению стадий злокачественных опухолей Американского объединенного комитета по онкологии (American Joint Commission on Cancer, AJCC) [52], в которую НЭО были включены впервые. Некоторые НЭН в соответствии с этой системой стадируют с использованием параметров, разработанных для экзокринных аналогов тех же органов (НЭН ПЖ). Для других НЭН созданы

Таблица 3. Морфологические признаки высоко- и низкодифференцированных нейроэндокринных новообразований

Признак	Высокодифференцированная нейроэндокринная опухоль	Низкодифференцированный нейроэндокринный рак	
		Мелкоклеточный тип	Крупноклеточный тип
Модель роста	Инсулярная Трабекулярная Ацинарная	Диффузная	Диффузная/ораноидная
Размер клеток	Средний	Мелкий/средний	Крупный
Цитоплазма	Средняя Эозинофильная Гранулярная	Узкая	Широкая Эозинофильная
Ядра	Круглые Хроматин гранулярный	Круглые или овальные Гиперхромные	Круглые Хроматин везикулярный
Ядрышки	Мелкие/незаметные	Незаметные	Отчетливые
Некрозы	Отсутствуют/фокальные	Обширные	Обширные
Число митозов ($\times 10$ HPF)	0–20	> 20	> 20
Индекс Ki-67, %	< 20	> 20	> 20

особые специфичные только для них критерии (НЭО желудка, тонкой кишки, толстой кишки, аппендикса).

Системы стадирования TNM (tumor, nodus и metastasis) ENETS и AJCC используют общепринятые показатели и совпадают для большинства отделов ЖКТ, но имеют существенные отличия для НЭО ПЖ и аппендикса. Исследования, посвященные сравнительному анализу данных систем, дают противоречивые результаты [53, 54]. Важно помнить о существовании 2 систем стадирования, так как клинические рекомендации ENETS основаны на критериях только одной из этих классификаций [55].

К дополнительным параметрам оценки прогноза относятся данные о наличии инвазии кровеносных и лимфатических сосудов, нейроинвазии, участков некроза, мультицентричности поражения. Морфологическое заключение должно содержать детальную информацию, необходимую для оценки критериев TNM-классификации.

Таким образом, в соответствии с критериями классификации WHO (2010) и системы TNM-стадирования алгоритм диагностики НЭН ЖКТ и ПЖ включает последовательное определение типа опухоли (с учетом особенностей морфологии и клеточного иммунофенотипа), степени злокачественности (на основе оценки пролиферативной активности клеток) и стадии (распространенности) новообразования (рис. 4). Все 3 этапа являются обязательными и дополняют друг друга, позволяя провести стратификацию риска прогрессирования заболевания и планирование терапии.

Противоречия и перспективы пересмотра классификации

Классификация WHO для НЭО пищеварительной системы, созданная в 2000 г. и модифицированная в 2010 г., постоянно пересматривается и дополняется

новыми данными. Новая классификация WHO, как ожидается, будет доступна в 2016/2017 г. и внесет ясность в целый ряд вопросов, к наиболее важным из которых относятся высококодифференцированные НЭО G_3 и смешанный адено-НЭР.

Высокодифференцированные НЭО G_3 представляют еще одну категорию НЭН пищеварительной системы, которая должна дополнить современную классификацию WHO (2010). Показано, что категория НЭН G_3 может включать как высоко-, так и низкодифференцированные новообразования [56]. НЭО G_3 — небольшая подгруппа опухолей в категории G_3 , которые наиболее часто выявляются в ПЖ и демонстрируют морфологию высококодифференцированных НЭО, но пролиферативную активность, соответствующую начальной категории G_3 (близкую к пороговому уровню G_2). Высокодифференцированные НЭО G_3 , как правило, имеют индекс Ki-67, варьирующий между 20 и 55 %, в то время как низкодифференцированный НЭР (крупно- и мелкоклеточный) обычно демонстрирует индекс Ki-67 > 55 %. Такое разделение клинически значимо, так как НЭО G_3 биологически и клинически менее агрессивны, чем низкодифференцированные карциномы, и в основном не отвечают на платиносодержащую химиотерапию [57, 58]. Критерии для диагностики НЭО G_3 будут уточняться с учетом более детальной морфологической оценки или анализа молекулярных маркеров. Оптимальные подходы к лечению данного типа НЭН продолжают изучаться в проспективных рандомизированных исследованиях, и ряд показаний уже включен в последние рекомендации ENETS 2016 г. [59].

Смешанный аденонейроэндокринный рак (MANEC) — сложный и противоречивый тип комбинированных новообразований, диагностика которого основывается на искусственном 30 % пороговом уровне, составляющем нейроэндокринную или ненейроэндокринную

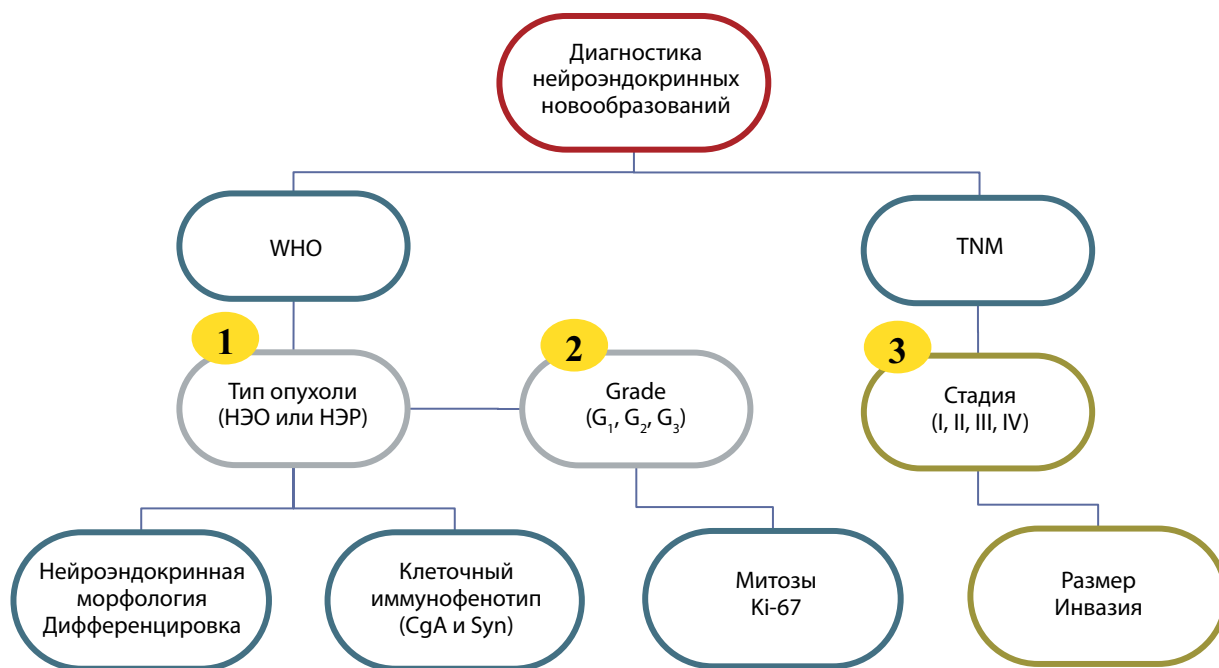


Рис. 4. Алгоритм морфологической диагностики нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы. НЭО – нейроэндокринная опухоль; НЭР – нейроэндокринный рак; TNM (tumor, nodus и metastasis) – международная классификация стадий злокачественных новообразований

популяции опухолевых клеток [60]. Нет достаточных доказательств того, что опухоли с меньшим объемом нейроэндокринного компонента имеют другое клиническое течение, поэтому диагноз аденокарциномы с нейроэндокринной дифференцировкой вызывает много вопросов. Термин «адено» также вводит в заблуждение, так как ненейроэндокринный компонент в опухолях некоторых локализаций может быть представлен плоскоклеточным раком. В легких опухолях, имеющие идентичный фенотип, обозначают как комбинированный мелкоклеточный или крупноклеточный НЭР независимо от выраженности ненейроэндокринного компонента. Точные диагностические признаки и критерии оценки биологического поведения этих опухолей остаются неясными и требуют дополнительного исследования.

Ключевые моменты для практической диагностики

- Морфология и клеточный иммунофенотип НЭН различных отделов пищеварительной системы имеют общие базовые характеристики, определяющие диагноз.
- Конкретная анатомическая локализация определяет целый ряд важных биологических и функциональных особенностей новообразования.
- Следует использовать утвержденные системы определения типа, степени злокачественности и стадии опухоли (WHO/ENETS/AJCC).
- Гистологическая дифференцировка опухоли отражает структурное сходство с нормальными аналогами и позволяет различить 2 фундаментально

отличных семейства НЭН: высокодифференцированные НЭО и прогностически неблагоприятный низкодифференцированный НЭР мелко- и крупноклеточного типов.

- Степень злокачественности НЭН ЖКТ и ПЖ определяется на основе оценки гистологии и клеточной пролиферации (количество митозов и индекс Ki-67) и связана с биологической агрессивностью опухоли.
- НЭН ЖКТ и ПЖ подразделяются с учетом количества митозов и индекса Ki-67 на G_1 (< 2 митозов в 10 НРФ, индекс Ki-67 ≤ 2 %), G_2 (2–20 митозов в 10 НРФ, индекс Ki-67 3–20 %) и G_3 (> 20 митозов в 10 НРФ, индекс Ki-67 > 20 %).
- Действующие в настоящее время пороговые уровни являются значимыми и должны использоваться в практической диагностике при исследовании первичной и метастатических опухолей.
- Стадия позволяет оценить степень распространенности опухоли на основе оценки размера, глубины инвазии, вовлечения регионарных лимфатических узлов и отдаленных органов.

Заключение

Морфологический спектр НЭН ЖКТ и ПЖ объединяет разнородную группу опухолей, которые развиваются в различных отделах пищеварительной системы. Эти опухоли имеют сходные морфологические особенности и признаки нейроэндокринной дифференцировки, но при этом значительно отличаются в зависимости от места возникновения, функционального статуса и уровня агрессивности. Системы опреде-

ления типа, степени злокачественности и стадии новообразований, предложенные WHO, ENETS и AJCC, позволяют стратифицировать НЭН ЖКТ и ПЖ с учетом прогноза заболевания и проводить обоснованное лечение.

Необходимы дальнейшие исследования для совершенствования современной номенклатуры и классификации НЭН пищеварительной системы, а также для разработки более специфичных прогностических маркеров и мишеней противоопухолевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Anlauf M. Neuroendocrine neoplasms of the gastroenteropancreatic system: pathology and classification. *Horm Metab Res* 2011;43(12):825–31. DOI: 10.1055/s-0031-1291307.
- Yao J.C., Hassan M., Phan A. et al. One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26(18):3063–72. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.4377.
- Sandvik O.M., Søreide K., Gudlaugsson E. et al. Epidemiology and classification of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms using current coding criteria. *Br J Surg* 2016;103(3):226–32. DOI: 10.1002/bjs.10034.
- Fraenkel M., Kim M., Faggiano A. et al. Incidence of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a systematic review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(3):153–63. DOI: 10.1530/ERC-13-0125.
- Öberg K. Neuroendocrine gastro-enteropancreatic tumors – from eminence based to evidence-based medicine – A Scandinavian view. *Scand J Gastroenterol* 2015;50(6):727–39. DOI: 10.3109/00365521.2015.1033001.
- Verbeek W.H., Korse C.M., Tesselaar M.E. GEP-NETs update: Secreting gastro-enteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers. *Eur J Endocrinol* 2016;174(1):1–7. DOI: 10.1530/EJE-14-0971.
- Wälenskamp A., Crespo G., Fierro Maya F. et al. Hallmarks of gastrointestinal neuroendocrine tumours: implications for treatment. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(6):445–60. DOI: 10.1530/ERC-14-0106.
- Meeker A., Heaphy C. Gastroenteropancreatic endocrine tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2014;386(1–2):101–20. DOI: 10.1016/j.mce.2013.07.015.
- Solcia E., Klöppel G., Sobin L. et al. Histological typing of endocrine tumours. 2nd edn. World Health Organization. Berlin: Springer, 2000.
- Klöppel G., Perren A., Heitz P.U. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann NY Acad Sci* 2004;1014:13–27. DOI: 10.1196/annals.1294.002.
- Klöppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 2011;18(Suppl 1):S1–16. DOI: 10.1530/ERC-11-0013.
- Klöppel G. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21(1):15–31. DOI: 10.1016/j.beem.2007.01.004.
- Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th edn. Lyon, France: IARC Press, 2010.
- Schmitt A.M., Blank A., Marinoni I. et al. Histopathology of NET: Current concepts and new developments. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30(1):33–43. DOI: 10.1016/j.beem.2016.02.002.
- Strosberg J., Nasir A., Coppola D. et al. Correlation between grade and prognosis in metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Hum Pathol* 2009;40(9):1262–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.01.010.
- Kidd M., Modlin I., Öberg K. Towards a new classification of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Nat Rev Clin Oncol* 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.85.
- Grillo F., Albertelli M., Annunziata F. et al. Twenty years of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: is reclassification worthwhile and feasible? *Endocrine* 2016;53(1):58–62. DOI: 10.1007/s12020-015-0734-3.
- Jiao Y., Shi C., Edil B.H. et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 2011;331(6021):1199–203. DOI: 10.1126/science.120060.
- Yachida S., Vakiani E., White C.M. et al. Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2012;36(2):173–84. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3182417d36.
- Kim J.Y., Hong S.M. Recent Updates on neuroendocrine tumors from the gastrointestinal and pancreatobiliary tracts. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(5):437–48. DOI: 10.5858/arpa.2015-0314-RA.
- Gurevich L., Kazantseva I., Isakov V.A. et al. The analysis of immunophenotype of gastrin-producing tumors of the pancreas and gastrointestinal tract. *Cancer* 2003;98(9):1967–76. DOI: 10.1002/cncr.11739.
- Kim J.Y., Kim M.S., Kim K.S. et al. Clinicopathologic and prognostic significance of multiple hormone expression in pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2015;39(5):592–601. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000383.
- Minnetti M., Grossman A. Somatic and germline mutations in NETs: Implications for their diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016;30(1):115–27. DOI: 10.1016/j.beem.2015.09.007.
- Uccella S., Sessa F., La Rosa S. Diagnostic approach to neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract and pancreas. *Turk Patoloji Derg* 2015;31(1)(Suppl 1):113–27. DOI: 10.5146/tjpath.2015.01319.
- Sorbye H., Strosberg J., Baudin E. et al. Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma. *Cancer* 2014;120(18):2814–23. DOI: 10.1002/cncr.28721.
- Basturk O., Tang L., Hruban R.H. et al. Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the pancreas: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2014;38(4):437–47. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000169.
- DeLellis R.A., Shin S.J., Treaba O.D. Immunohistochemistry of endocrine tumors. Ed. by D.J. Dabbs. In book: *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. 3rd edn. Elsevier Inc, 2010. Pp. 291–329.
- Klimstra D.S., Modlin I.R., Adsay N.V. 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(3):300–13. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181ce1447.
- Saqi A., Alexis D., Remotti F., Bhagat G. Usefulness of CDX-2 and TTF-1 in differentiating gastrointestinal from pulmonary carcinoids. *Am J Clin Pathol* 2005;123(3):394–404. DOI: 10.1309/ukn6-pvrk-xhg4-22da.
- Schmitt A.M., Riniker F., Anlauf M. et al. Islet 1 (Isl-1) expression is a reliable marker for pancreatic endocrine tumors and their metastases. *Am J Surg Pathol* 2008;32(3):420–5. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318158a397.
- Srivastava A., Hornick J.L. Immunohistochemical staining for CDX-2, PDX-1, NESP-55, and TTF-1 can help distinguish

- gastrointestinalcarcinoid tumors from pancreatic endocrine and pulmonary carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol* 2009;33(4):626–32. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31818d7d8b.
32. Chan E.S., Alexander J., Swanson P.E. et al. PDX-1, CDX-2, TTF-1, and CK7: a reliable immunohistochemical panel for pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2012;36(5):737–43. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31824aba59.
33. Long K.B., Srivastava A., Hirsch M.S., Hornick J.L. PAX-8 Expression in well-differentiated pancreatic endocrine tumors: correlation with clinicopathologic features and comparison with gastrointestinal and pulmonary carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol* 2010;34(5):723–9. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181da0a20.
34. Sangoi A.R., Ohgami R.S., Pai R.K. et al. PAX-8 expression reliably distinguishes pancreatic well-differentiated neuroendocrine tumors from ileal and pulmonary well-differentiated neuroendocrine tumors and pancreatic acinar cell carcinoma. *Mod Pathol* 2011;24(3):412–24. DOI: 10.1038/modpathol.2010.176.
35. Tseng I.C., Yeh M.M., Yang C.Y., Jeng Y.M. NKX6-1 is a novel immunohistochemical marker for pancreatic and duodenal neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2015;39(6):850–7. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000435.
36. Salaria S., Means A., Revetta F. et al. Expression of CD24, a stem cell marker, in pancreatic and small intestinal neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol* 2015;144(4):642–8. DOI: 10.1309/AJCPMZY5P9TWNJJV.
37. Jamali M., Chetty R. Predicting prognosis in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: an overview and the value of Ki-67 immunostaining. *Endocr Pathol* 2008;19(4):282–8. DOI: 10.1007/s12022-008-9044-0.
38. Körner M., Waser B., Reubi J.C. Does somatostatin or gastric inhibitory peptide receptor expression correlate with tumor grade and stage in gut neuroendocrine tumors? *Neuroendocrinology* 2015;101(1):45–57. DOI: 10.1159/000371804.
39. Делекторская В.В. Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологические и молекулярные особенности. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(1):52–60. [Delektorskaya V.V. Neuroendocrine tumors of the digestive system: pathologic and molecular characteristics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(1):52–60. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805x.2015.2.1.52–60.
40. Qian Z.R., Ter-Minassian M., Chan J.A. et al. Prognostic significance of MTOR pathway component expression in neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 2013;31(27):3418–25. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.6946.
41. Schmitt A.M., Pavel M., Rudolph T. et al. Prognostic and predictive roles of MGMT protein expression and promoter methylation in sporadic pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Neuroendocrinology* 2014;100(1):35–44. DOI: 10.1159/000365514.
42. Marinoni I., Kurrer A.S., Vassella E. et al. Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Gastroenterology* 2014;146(2):453–60. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.020.
43. Rindi G., Klöppel G., Alhman H. et al. TNM staging of foregut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006;449(4):395–401. DOI: 10.1007/s00428-006-0250-1.
44. Voss S.M., Riley M.P., Lokhandwala P.M. et al. Mitotic count by phosphohistone H3 immunohistochemical staining predicts survival and improves interobserver reproducibility in well-differentiated neuroendocrine tumors of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2015;39(1):13–24. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000341.
45. 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. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.06.011.
46. Делекторская В.В., Козлов Н.А., Чемерис Г.Ю. Клинико-морфологический анализ новообразований гастроэнтеропанкреатической системы. *Клиническая лабораторная диагностика* 2013;(10):48–50; 10–3. [Delektorskaya V.V., Kozlov N.A., Chemeris G.Yu. Clinico-morphological analysis of the neuroendocrine neoplasms of the gastroenteropancreatic system. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2013;(10):48–50, 10–3. (In Russ.)].
47. Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е. Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологический спектр и клеточная пролиферация (индекс Ki-67). *Вестник РАМН* 2013;(5):28–37. [Delektorskaya V.V., Kushliskiy N.E. Neuroendocrine tumors of digestive system: morphologic spectrum and cell proliferation (Ki-67 index). *Vestnik RAMN = RAMS Herald* 2013;(5):28–37. (In Russ.)]. DOI: 10.15690/vramn.v68i5.660.
48. Grillo F., Albertelli M., Brisigotti M.P. et al. Grade increases in gastro-entropancreatic neuroendocrine tumor metastases compared to the primary tumor. *Neuroendocrinology* 2015. <http://dx.doi.org/10.1159/000439434>.
49. Kroneman T.N., Voss J.S., Lohse C.M. et al. Comparison of three Ki-67 index quantification methods and clinical significance in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 2015;26(3):255–62. DOI: 10.1007/s12022-015-9379-2.
50. Blank A., Wöheck L., Marinoni I. et al. Interlaboratory variability of MIB-1 staining in well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 2015;467(5):543–50. DOI: 10.1007/s00428-015-1843-3.
51. Klöppel G., Rindi G., Perren A. et al. The ENETS and ACC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch* 2010;456(6):595–7. DOI: 10.1007/s00428-010-0924-6.
52. Edge S.B., Byrd D.R., Compton C.C. et al. *AJCC cancer staging manual*. 7th edn. American joint commission on cancer. New York: Springer, 2010.
53. Rindi G., Falconi M., Klersy C. et al. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(10):764–77. DOI: 10.1093/jnci/djs208.
54. Qadan M., Ma Y., Visser B.C. et al. Reassessment of the current American Joint Committee on Cancer staging system for pancreatic neuroendocrine tumors. *J Am Coll Surg*. 2014;218(2):188–95. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.11.001.
55. Delle Fave G., O’Toole D., Sundin A. et al. ENETS consensus guidelines update for gastroduodenal neuroendocrine neoplasms. *Neuroendocrinology* 2016;103(2):119–24. DOI: 10.1159/000443168.
56. Tang L.H., Basturk O., Sue J.J., Klimstra D.S. A practical approach to the classification of WHO Grade 3 (G₃) well-differentiated neuroendocrine tumor (WD-NET) and poorly differentiated neuroendocrine carcinoma (PD-NEC) of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2016;40(9):1192–202. DOI: 10.1097/pas.0000000000000662.
57. Tang L.H., Untch B.R., Reidy D.L. et al. Well-differentiated neuroendocrine tumors with a morphologically apparent high-grade component: a pathway distinct from poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Clin Cancer Res* 2016;22(4):1011–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0548.
58. Milione M., Maisonneuve P., Spada F. et al. The clinicopathologic heterogeneity of Grade 3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: morphological differentiation and proliferation identify different prognostic categories. *Neuroendocrinology* 2016. DOI: 10.1159/000445165.
59. Garcia-Carbonero R., Sorbye H., Baudin E. et al. ENETS consensus guidelines for high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and neuroendocrine carcinomas. *Neuroendocrinology* 2016;103(2):186–94. DOI: 10.1159/000443172.
60. La Rosa S., Sessa F., Uccella S. Mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasms (MiNENs): unifying the concept of a heterogeneous group of neoplasms. *Endocr Pathol* 2016. DOI: 10.1007/s12022-016-9432-9.

Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки

Т.И. Фетисов¹, Л.Р. Тилова¹, Е.А. Лесовая^{1,2}, Е.Е. Антошина¹, Т.Г. Горькова¹, Л.С. Труханова¹,
О.В. Морозова¹, Е.В. Шипаева³, Р.В. Иванов³, А.А. Пурмаль⁴, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, А.В. Гудков⁴, К.В. Гурова⁴, К.И. Кирсанов¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России;
Россия, 390026, Рязань, ул. Высоковольтная, 9;

³ООО «Инкурон»; Россия, 121069, Москва, Столовый переулок, 6;

⁴Онкологический центр Розвел Парк; США, Баффало

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов mrkir@rambler.ru

Кураксины представляют собой низкомолекулярные карбазольные производные, обладающие афинностью к ДНК, способные одновременно активировать p53-зависимый апоптоз и ингибировать NF-kB-зависимый сигнальный путь. На модели перевиваемой аденокарциномы толстой кишки (Акатол) на мышах линии BALB/c продемонстрировано противоопухолевое действие кураксина CBL0137. Наблюдалась значительное тормозящее действие CBL0137 на рост данной аллографтной опухоли: на 37-е сутки после перевивки опухоли при пероральном введении препарата в дозах 5, 10, 15 и 20 мг/кг в день торможение роста опухоли составило 53, 50, 56 и 74 % соответственно. Значимое увеличение продолжительности жизни наблюдалось во всех группах животных, получавших CBL0137. Максимальный эффект (81,7 %) был получен при введении препарата в дозе 20 мг/кг в день. В экспериментах *in vitro* при обработке клеток аденокарциномы толстой кишки человека HTC116 наблюдался значительный цитотоксический эффект. CBL0137 проявил способность ингибировать экспрессию гена COX2, обладающего антиапоптотическим действием и способностью стимулировать неоваскуляризацию и метастазирование. Таким образом, в системах *in vivo* и *in vitro* продемонстрировано противоопухолевое действие CBL0137 в отношении аденокарциномы толстой кишки.

Ключевые слова: аденокарцинома толстой кишки, перевиваемая опухоль, Акатол, кураксин, CBL0137, NF-kB-зависимый сигнальный путь, COX2

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-67-72

Antitumor effect of the curaxin CBL0137 on the models of colon cancer

T.I. Fetisov¹, L.R. Tilova¹, E.A. Lesovaya^{1,2}, E.E. Antoshina¹, T.G. Gor'kova¹, L.S. Trukhanova¹, O.V. Morozova¹, E.V. Shipaeva³,
R.V. Ivanov³, A.A. Purmal⁴, G.A. Belitskiy¹, M.G. Yakubovskaya¹, A.V. Gudkov⁴, K.V. Gurova⁴, K.I. Kirsanov¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Reseach Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²I.P. Pavlov Ryazan' State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vasokovol'tnaya St., Ryazan, 390026, Russia;

³LLC Incuron; 6 Stolovyy Pereulok, Moscow, 121069, Russia;

⁴Roswell Park Cancer Institute; Buffalo, USA

Curaxins represent low molecular weight carbazole derivatives, which simultaneously activate p53-dependent apoptosis and inhibit NF-kB-dependent signal transduction pathways. Antitumor activity of curaxin CBL0137 was demonstrated *in vivo* on the model of solid transplantable mouse colon adenocarcinoma Akatol. Significant tumor growth inhibition caused by CBL0137 treatment was observed. On the 37th day after tumor transplantation for CBL0137 oral doses 5, 10, 15 and 20 mg/kg the tumor growth inhibition indexes were 53, 50, 56 and 74 %, respectively. CBL0137 treatment extended life span of mice in all study groups receiving this test article. Maximum lifespan increase (81,7 %) was observed in the group of mice treated with 20 mg/kg dose of CBL0137. The cytotoxicity of CBL0137 was assessed on human colon cancer cells *in vitro*. We demonstrated that CBL0137 inhibits the expression COX2, which in its turn is known to exhibit antiapoptotic, pro-angiogenic and pro-metastatic properties. Thus, we demonstrated antitumor effect of CBL0137 against colon cancer *in vitro* and *in vivo*.

Key words: colon adenocarcinoma, transplantable tumor, Akatol, curaxin, CBL0137, NF-kB-signal transduction pathway, COX2

Введение

Одна из наиболее распространенных нозологических форм среди онкологических заболеваний — рак толстой кишки (РТК). Ежегодно рак этой нозологической формы возникает более чем у 1 млн человек

и более 600 тыс. человек погибают от него [1]. В связи с этим продолжается поиск новых противоопухолевых препаратов, эффективных для лечения РТК. Одним из новых направлений химиотерапии, активно разрабатываемых в последнее десятилетие, является поиск

препаратов, молекулярные механизмы действия которых связаны с ингибированием нескольких пролиферативных сигнальных путей и одновременной индукцией апоптоза [2–5]. К таким препаратам относятся кураксины – низкомолекулярные соединения, вызывающие одновременно как активацию р53-зависимого апоптоза, так ингибирование NF-κB-зависимого сигнального пути [6, 7].

Цель исследования – оценка способности кураксина CBL0137 ингибировать рост аденокарциномы толстой кишки с использованием модельных систем данного заболевания *in vivo* и *in vitro*.

Удобной моделью РТК для оценки противоопухолевой активности химиопрепаратов считается перевиваемая мышинная аденокарцинома Акатол [8]. Опухолевый штамм Акатол характеризуется 100 % перевиваемостью и умеренной скоростью роста, что позволяет проводить оценку противоопухолевой эффективности препаратов и выбор оптимальных для лечения доз. Для оценки цитотоксического действия препарата была выбрана распространенная модель аденокарциномы толстой кишки *in vitro* – культура клеток НТС116.

Одно из ключевых событий в генезе РТК как у мышей, так и у человека – активация хронического воспаления через сигнальный путь AA/COX2 [9, 10]. Активация COX2 приводит к повышению уровня метаболизма арахидоновой кислоты в биоактивные простагландины и тромбоксаны. В частности, повышается уровень PGE₂, который обладает провоспалительным, антиапоптотическим эффектами, а также способствует метастазированию и неоангиогенезу [11, 12]. Антиапоптотический механизм действия PGE₂ реализуется через подавление экспрессии Bcl2 при активации MAPK или PI3K [13, 14]. Одним из регуляторов экспрессии гена COX2 является NF-κB [15]. Ранее было показано, что ингибирование NF-κB – одной из ключевых мишеней CBL0137 – в клетках РТК ведет к снижению экспрессии COX2 [6]. В клетках линии НТС116 уровень экспрессии гена COX2 достаточно высок, а дополнительная его активация может быть проведена при добавлении в среду фактора некроза опухоли α (tumor necrosis factor α, TNF-α).

Таким образом, для оценки противоопухолевого потенциала CBL0137 в отношении аденокарциномы толстой кишки в качестве модельной системы *in vivo* был выбран опухолевый штамм Акатол, а для изучения цитотоксического эффекта и молекулярных механизмов его действия *in vitro* использовали клетки линии аденокарциномы толстой кишки человека НТС116.

Материалы и методы

Расходные материалы. В качестве тестируемого препарата использовали соединение CBL0137 (партия 10-106-88-30), предоставленное LLC Incurgon (США). CBL0137 вводили с помощью гастрального зонда в растворе, содержащем 0,2 % гидроксипропилметилцеллюлозы (МЦ) (Sigma-Aldrich, США). Раствор 0,2 % МЦ

готовили еженедельно (хранение при температуре +4 °С), а раствор CBL0137 – ежедневно, непосредственно перед введением мышам. В качестве препарата сравнения использовали 5'-фторурацил (5-ФУ) (EBEWE, Arzneimittel Gee. m. b. H., Австрия).

Лабораторные животные. Все эксперименты на животных выполняли в соответствии с требованиями этического комитета РОНЦ им. Н.Н. Блохина по работе с животными. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде (стерильная питьевая вода). В качестве основного корма использовали стандартизованные брикетированные гранулированные корма для мышей. Показатели массы тела регистрировали ежедневно на протяжении всего эксперимента.

Опыты проводили на 150 самцах мышей линии BALB/c, которые были получены из разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина в возрасте 1 мес (масса тела 21–22 г). Животные были рандомизированы на 6 групп: 1–4-я (экспериментальные) с введением различных доз CBL0137 (5, 10, 15 и 20 мг/кг соответственно, 5-я (экспериментальная) с введением известного антиметаболита 5-ФУ, 6-я (контрольная) с введением лишь 0,2 % МЦ. Перед началом эксперимента все животные были помечены, взвешены и рассажены в клетки по 10 мышей в каждой.

Перевиваемая опухоль аденокарциномы толстой кишки Акатол. Исследования выполняли на перевиваемой мышинной опухоли Акатол по стандартной методике [8]. Для получения достаточного количества перевиваемого материала образец опухолевой ткани был взят из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина и перевит подкожно мышам-самцам линии BALB/c. Через 3 нед для проведения эксперимента опухолевую массу измельчали, разводили из расчета 1 г в 10 мл физиологического раствора и вводили по 0,5 мл подкожно животным всех групп. После развития видимых опухолевых узлов измеряли их длину, ширину и глубину и рассчитывали объем опухоли.

Оценка экспериментальных данных.

- **Время появления первых узелков.** Для определения времени появления первых опухолевых узелков проводили ежедневную пальпацию мышей в течение 1-й недели после перевивки опухоли. Процент увеличения времени до появления первых узелков определяли по формуле:

$$\text{Процент увеличения времени до появления первых узелков} = \frac{(\text{Среднее время появления узелков в опыте}) - (\text{Среднее время появления узелков в контроле})}{(\text{Среднее время появления узелков в контроле})} \times 100 \%$$

- **Торможение роста опухоли.** О противоопухолевом действии исследуемых препаратов судили также по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольной и опытных группах. Объ-

ем вычисляли как произведение величин 3 взаимно перпендикулярных размеров опухоли. Измерение опухолей проводили 3 раза в неделю. Процент торможения роста опухоли по объему определяли на каждое ее измерение и вычисляли по формуле:

$$\text{Процент торможения роста опухоли по объему} = \frac{(\text{Средний объем опухоли в контроле}) - (\text{Средний объем опухоли в опыте})}{(\text{Средний объем опухоли в контроле})} \times 100 \%$$

- **Продолжительность жизни животных.** Критерием эффективности действия препаратов служила также продолжительность жизни животных. Согласно различным зарубежным документам, регламентирующим работу с экспериментальными животными [16], размер перевиваемой опухоли определяет выбывание экспериментального животного из группы. При этом учитывают 2 фактора: отсутствие влияния опухоли на жизненные функции организма и соотношение массы опухоли и массы организма. В связи с этим при обработке результатов использовали подход, при котором животное выбывало из экспериментальной группы при достижении опухолью объема, равного 10 см³. Процент увеличения продолжительности жизни животных вычисляли по формуле:

$$\text{Процент увеличения продолжительности жизни} = \frac{(\text{Средняя продолжительность жизни в опыте}) - (\text{Средняя продолжительность жизни в контроле})}{(\text{Средняя продолжительность жизни в контроле})} \times 100 \%$$

Клеточные линии. В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека HCT116. Клетки культивировали в стандартных условиях (+37 °С, 5 % CO₂) в культуральной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, двойная модификация среды Игла) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %) и смеси антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамина. В эксперименте использовали TNF-α (1 мкМ) и CBL0137 (0,25 мкМ). Обработку клеток проводили в нескольких режимах:

- инкубация с TNF-α в течение 24 ч;
- инкубация с CBL0137 в течение 24 ч;
- инкубация с TNF-α и CBL0137 в течение 24 ч;
- инкубация с TNF-α в течение 12 ч, а затем с CBL0137 в течение 12 ч.

МТТ-тест. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (BD Micro-Fine Plus, США) (3×10³ клеток в 190 мкл культуральной среды) и инкубировали 24 ч. В день экспериментов приготавливали серийные разведения CBL0137. Клетки инкубировали с CBL0137, затем вно-

сили 20 мкл раствора МТТ-реагента (5 мг/мл, ПанЭко, Россия) в солевом растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) и инкубировали 2 ч при температуре +37 °С до появления фиолетовой окраски. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия) и инкубировали при температуре +37 °С. После полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре MultiScan MCC 340 (Labsystems, США) при длине волны 570 нм. Данные представляли в виде оптической плотности экспериментальных образцов относительно контроля. За 100 % принимали оптическую плотность в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие соединения, но с растворителем ДМСО.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Общую РНК выделяли с использованием набора реагентов GeneJET™ в соответствии с инструкцией изготовителя. Анализ уровня экспрессии гена *COX2* проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Для количественной оценки изменений уровня экспрессии применяли метод определения по пороговому циклу [17]. Нормализацию образцов выполняли по отношению к количеству матричной РНК гена домашнего хозяйства *Rpl27* [18].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Время появления первых узелков на месте перевивки опухоли. В эксперименте время появления первых опухолевых узелков во всех группах достоверно не различалось и составило около 6 сут. Пероральное введение CBL0137 начинали на следующий день после перевивки опухоли. Следует отметить, что в 4-й группе (доза CBL0137 20 мг/кг) наблюдалась некоторая тенденция к задержке появления первых опухолевых узелков по сравнению с остальными группами (табл. 1).

Таблица 1. Время появления первых узелков у мышей на месте перевивки опухоли

Группа	Среднее время появления первых опухолевых узелков, сутки	Увеличение времени появления первых узелков, %
1-я (CBL0137, 5 мг/кг)	6,04 ± 0,17*	-0,7
2-я (CBL0137, 10 мг/кг)	6,04 ± 0,20*	-0,7
3-я (CBL0137, 15 мг/кг)	6,40 ± 0,20*	5,0
4-я (CBL0137, 20 мг/кг)	6,64 ± 0,23*	8,4
5-я (5'-фторурацил, 25 мг/кг)	6,36 ± 0,24*	4,4
6-я (контрольная)	6,08 ± 0,20	-

*Различия экспериментальных и контрольной групп статистически незначимы, $p > 0,05$.

Торможение роста опухоли. Сравнительный анализ данных по объему показал, что в течение первых 9 сут статистически значимых различий между экспериментальными и контрольной группами не наблюдалось. К 12-м суткам достоверное торможение роста опухоли по объему отмечали у мышей 4-й (43 %) и 5-й (84 %) групп. Начиная с 19-х суток и до завершения эксперимента у мышей, получавших CBL0137, наблюдалось достоверное торможение роста опухоли по объему. При этом наибольшую задержку в росте опухолевого узла в период 12–54-е сутки отмечали в 4-й группе (на 37-е сутки зарегистрировано максимальное торможение роста опухоли на 74 %) (рис. 1).

Максимальный (84 %) эффект торможения роста опухоли при воздействии 5-ФУ (5-я группа) проявился на 12-е сутки после перевивки (4-е сутки после начала введения 5-ФУ), и уже начиная с 14-х суток (сразу после окончания введения 5-ФУ) происходило постепенное снижение торможения роста опухолевого узла. С 35-х суток и до завершения эксперимента

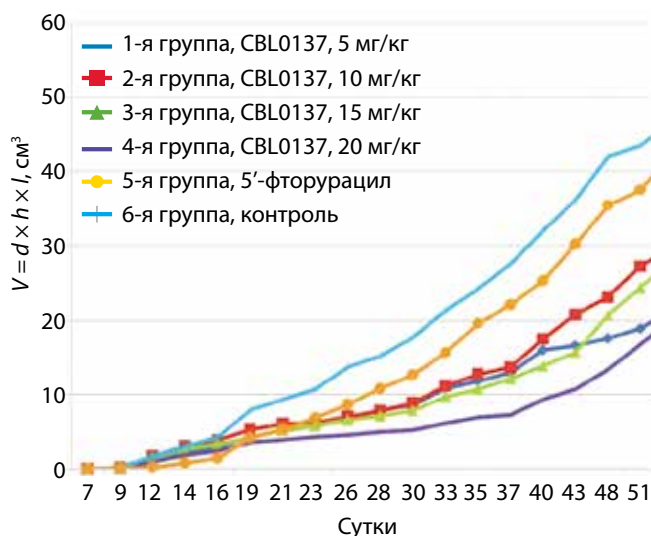


Рис. 1. Динамика роста перевиваемых опухолей у экспериментальных животных

достоверных отличий в средних размерах опухолевого узла у мышей 5-й и 6-й групп не отмечалось.

Продолжительность жизни животных. Животное выбывало из экспериментальной группы при достижении опухолью объема 10 см³. Статистически значимое увеличение времени достижения опухолью такого объема наблюдалось во всех экспериментальных группах (рис. 2).

Максимальное увеличение (81,7 %) продолжительности жизни отмечено у мышей 4-й группы. Даже при использовании наименьшей дозы CBL0137 (5 мг/кг) зафиксировано значительное увеличение продолжительности жизни. Эффект 5-ФУ в данном эксперименте оказался заметно слабее (табл. 2).

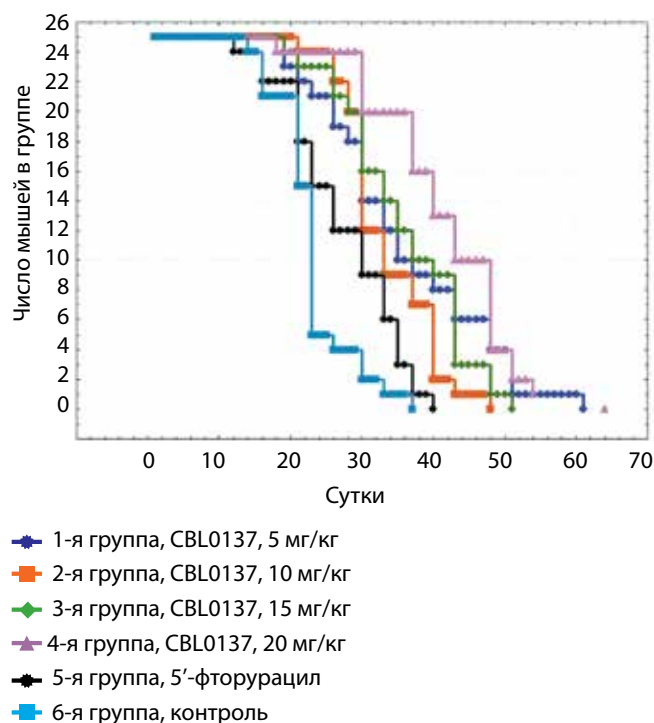


Рис. 2. Продолжительность жизни животного при выбывании его из группы по достижении объема опухоли 10 см³

Таблица 2. Показатели продолжительности жизни животного при выбывании его из группы по достижении объема опухоли 10 см³

Группа	Средняя продолжительность жизни ± стандартная ошибка среднего, сутки	Увеличение продолжительности жизни, %	Медианная продолжительность жизни, сутки	Log-rank-тест
1-я (CBL0137, 5 мг/кг)	35,64 ± 2,23**	55,22	33	p < 0,001
2-я (CBL0137, 10 мг/кг)	33,32 ± 1,24**	45,12	30	p < 0,001
3-я (CBL0137, 15 мг/кг)	35,68 ± 1,71**	55,40	35	p < 0,001
4-я (CBL0137, 20 мг/кг)	41,72 ± 1,90**	81,70	43	p < 0,001
5-я (5'-фторурацил, 25 мг/кг)	27,32 ± 1,47*	18,99	26	p < 0,05
6-я (контрольная)	22,96 ± 1,02	—	23	—

Примечание. Log-rank-тест — логарифмический ранговый тест, указана статистическая значимость при сравнении кривой выживания данной группы с кривой выживания 6-й (контрольной) группы. *Статистически значимые различия по отношению к контрольной группе, p < 0,05. **Статистически значимые различия по отношению к контрольной группе, p < 0,01.

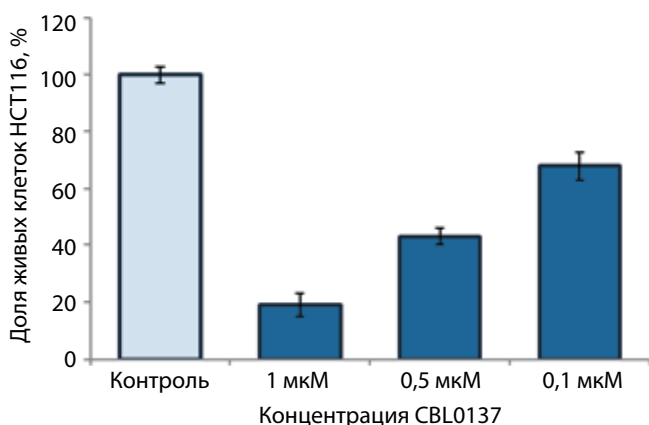


Рис. 3. Цитотоксическое действие CBL0137 на клетки линии HCT116

Цитотоксический эффект на клетках линии рака толстой кишки человека. Полученные на линии клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 данные свидетельствуют о значительном цитотоксическом эффекте CBL0137 (рис. 3). При использовании МТТ-теста было обнаружено, что в результате 72-часовой инкубации в концентрации 1 мкМ CBL0137 уменьшал число живых клеток HCT116 на 81 % по сравнению с контролем. При обработке клеток более низкими концентрациями CBL0137 наблюдалась четкая дозовая зависимость. Концентрация препарата, вызывающая гибель 50 % клеток (IC50) при данном времени обработки, составила 0,4 мкМ.

Влияние CBL0137 на экспрессию COX2 in vitro. Продукт гена COX2 обладает антиапоптотическими свойствами и участвует в метастазировании и неоангиогенезе. При исследовании на клеточной линии HCT116 влияния CBL0137 на экспрессию гена COX2, мы продемонстрировали, что он воздействует как на конститутивный, так и на индуцированный уровень экспрессии COX2 (рис. 4). Так, при действии CBL0137 в концентрации 0,25 мкМ в течение 24 ч уровень матричной РНК гена COX2 уменьшился в 2 раза по сравнению с конститутивным уровнем. Индукция экспрессии гена COX2 провоспалительным цитокином TNF-α (1 мкМ в течение 24 ч) привела к увеличению экспрессии гена в 5 раз. При совместном действии TNF-α (1 мкМ) и CBL0137 (0,25 мкМ) в течение 24 ч мы наблюдали уменьшение экспрессии гена COX2 в 2 раза по сравнению с индуцированным уровнем. При последовательной обработке (сначала 12 ч TNF-α, а затем 12 ч CBL0137) уровень экспрессии гена COX2 снизился примерно в 5 раз

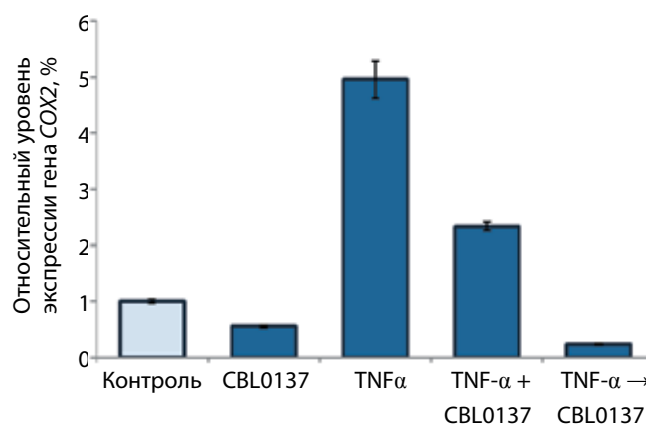


Рис. 4. Влияние CBL0137 на экспрессию гена COX2

относительно конститутивного уровня и более чем в 20 раз относительно индуцированного.

Полученный более интенсивный эффект ингибирования экспрессии гена COX2 при последовательной обработке TNF-α, а затем CBL0137 может объясняться различиями во времени обработки CBL0137 (12 ч). Кроме этого, если произошла некоторая адаптация к стимулирующему действию TNF-α, то его отмена могла привести к снижению экспрессии COX2 ниже конститутивного уровня, что, вероятно, обусловило более значимый эффект последующей обработки CBL0137.

Таким образом, в представленном исследовании продемонстрирован значимый противоопухолевый эффект кураксина CBL0137, проявляющийся в замедлении роста опухоли и увеличении продолжительности жизни животных с перевитыми опухолями. На культуре клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 показан цитотоксический эффект препарата. Одним из возможных молекулярных механизмов действия CBL0137 является его ингибирующее влияние на экспрессию гена COX2, обладающего антиапоптотической активностью и способностью стимулировать ангиогенез опухолей толстой кишки. Способность CBL0137 ингибировать циклооксигеназу дает основание для исследования данного препарата в качестве нестероидного противовоспалительного средства, а также для изучения его антиканцерогенных свойств и возможного использования в противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-09216А.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65(2):87–108.

2. Dey A., Tergaonkar V., Lane D.P. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53

and NF-kappaB pathways. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(12): 1031–40.

3. Guo C., Gasparian A.V., Zhuang Z. et al. 9-Aminoacridine-based anticancer drugs target the PI3K/AKT/mTOR, NF-kappaB and p53 pathways. *Oncogene* 2009;28(8):1151–61.
4. Gurova K. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future Oncol* 2009;5(10):1685–704.
5. Dermawan J.K., Gurova K., Pink J. Quinacrine overcomes resistance to erlotinib by inhibiting FACT, NF-κB, and cell-cycle progression in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13(9):2203–14.
6. Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purmal A.A. et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-κB and activate p53 by targeting FACT. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra74.
7. Barone T.A., Burkhart C.A., Safina A. et al. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma. *Neuro Oncol* 2016.
8. Герасимова Г.К., Маркова Н.П., Голубева И.С. и др. Противоопухолевая активность препарата Стелланин на перевиваемых опухолях мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;(1): 43–8. [Gerasimova G.K., Markova N.P., Golubeva I.S. et al. Antitumor activity of the drug Stellanin on transplantable mice tumors. *Russiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2014;(1):43–48. (In Russ.)].
9. Eberhart C.E., Coffey R.J., Radhika A. et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107(4):1183–8.
10. Taketo M.M. COX-2 and colon cancer. *Inflamm Res* 1998;47(Suppl 2):S112–6.
11. Jones M.K., Wang H., Peskar B.M. et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999;5(12):1418–23.
12. Tsujii M., Kawano S., DuBois R.N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(7):3336–40.
13. Tessner T.G., Muhale F., Riehl T.E. et al. Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J Clin Invest* 2004;114(11):1676–85.
14. Pozzi A., Yan X., Macias-Perez I. et al. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* 2004;279(28):29797–804.
15. Plummer S.M., Holloway K.A., Manson M.M. et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-κB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999;18(44):6013–20.
16. Olfert E., Bhasin J., Latt R. et al. The CCAC guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing were developed by the ad hoc subcommittee on endpoints of the CCAC Guidelines Committee: Ernest O. et al. 1998.
17. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
18. de Jonge H.J., Fehrmann R.S., de Bont E.S. et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2007;2(9):e898.

Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза

В.П. Дерягина¹, Н.И. Рыжова¹, Л.В. Кривошеева¹, И.С. Голубева², Л.А. Савлущинская¹, Д.А. Хоченков²

¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза,

²научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валентина Петровна Дерягина derygina@inbox.ru

Изучены в динамике образование метаболитов оксида азота (NO): нитритов, нитратов, летучих нитрозаминов, а также экспрессия фермента – индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в экспериментах на мышах с подкожно перевиваемыми, спонтанными и химически индуцированными опухолями. Выявлено повышенное образование нитритов + нитратов в опухолях или их выделение с мочой при росте опухолей независимо от их гистологического типа. Суммарная концентрация нитритов и нитратов в опухолях достигает микромолярных уровней, характерных для нитрозирующего стресса. Способность перитонеальных макрофагов + моноцитов генерировать нитриты подавляется на стадии интенсивного роста карциномы легких Льюиса, что может указывать на снижение цитотоксических свойств иммунных клеток. Показана возможность образования в опухолях карциномы Эрлиха летучих N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина – соединений с выраженными канцерогенными свойствами. С использованием иммуногистохимического метода выявлена положительная экспрессия iNOS в отдельных участках опухолевой ткани карциномы легких на всех контролируемых сроках роста опухолей. Иммуноокрашивание отсутствовало или было слабым в метастазах легких. Это может свидетельствовать о селекционном отборе клеток с низкой активностью iNOS, мигрирующих в легкие.

Ключевые слова: биосинтез, метаболиты оксида азота, нитриты, нитраты, нитрозамины, макрофаги, экспрессия iNOS, перевиваемые опухоли, спонтанные опухоли, химически индуцированные опухоли

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73–80

iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course of tumor growth of different histogenesis

V.P. Deryagina¹, N.I. Ryzhova¹, L.V. Krivosheeva¹, I.S. Golubeva², L.A. Savluchinskaya¹, D.A. Khochenkov²

¹Research Institute of Carcinogenesis,

²Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Cancer, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

The dynamics of the production of nitric oxide (NO) metabolites: nitrites, nitrates, volatile nitrosamines and iNOS expression was studied in mice with subcutaneous transplanted, spontaneous and chemical- induced tumors. Tumor growth was accompanied by increased production of nitrites + nitrates in tumors or their release with urine that not dependent on tumor histotype. The total concentration of nitrites and nitrates in tumors reached micromolar levels characteristic of nitrosative stress. The ability of peritoneal macrophages + monocytes to generates nitrites was suppressed at the stage of intensive growth of the Lewis lung carcinoma, which may indicate a decrease in the cytotoxic properties of immune cells. The possibility of formation in the Erlich carcinoma of volative N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine compounds with pronounced carcinogenic properties was demonstrated. A positive expression of iNOS was revealed in some areas of lung carcinoma at all investigated time points using the immunohistochemical method. The lungs metastases were not stain or weakly stained. This may indicate selection of the cells with a low activity of iNOS migrating in the lungs.

Key words: biosynthesis, nitric oxide metabolites, nitrites, nitrates, N-nitrosamines, macrophages, expression of iNOS, transplanted tumors, spontaneous tumors, chemical-induced tumors

Введение

Оксид азота (NO) – универсальный и необходимый регулятор физиологических реакций: иммунных, нейрональных, сосудистых и др. [1]. За последние десятилетия получены убедительные доказательства участия NO в патогенезе злокачественных опухолей [2, 3]. Известно, что синтез NO осуществляется многими типами клеток, в том числе опухолевыми, и основан на ферментативной трансформации гуанидинового фрагмента аминокислоты L-аргинина в реакции с кислородом

с участием коферментов NADPH, FAD, FMN, тетрагидриобиптерина и NO-синтаз (NOS) [4, 5]. Полагают, что многократное повышение образования NO в опухолях является следствием активации одной из изоформ NOS – индуцибельной NOS (iNOS) под влиянием провоспалительных и антипатогенных факторов: интерферона γ , фактора некроза опухоли α , интерлейкина 1β , бактериального липополисахарида, белков теплового шока и др. [6, 7]. Продолжительная гиперпродукция NO и его метаболитов (нитритов, перокси-

нитрита, окислов азота, нитрозаминов) приводит к повреждению ДНК через дезаминирование и нитрование оснований, алкилирование, образование аддуктов, дозозависимых разрывов, а также посттрансляционной химической модификации ДНК-репарирующих ферментов, способствуя таким образом прогрессии опухолей [8–11]. Данные клинических исследований показывают, что содержание и активность iNOS существенно увеличиваются в опухолях различной локализации и гистогенеза и положительно коррелируют со стадией и плохим прогнозом у больных меланомой, при опухолях молочной железы, яичников, головы и шеи и колоректальной карциноме [8]. Формирование биологического ответа клеток на действие NO зависит от его концентрации в клетках и межклеточной среде, а также от времени поддержания этих концентраций [12–14]. В то же время внимание исследователей сосредоточено на изучении реакций NO с ключевыми реагентами (кислород и его активные формы, углекислый газ и др.) и на биохимических (под влиянием NO) модификациях белков, содержащих гем, тиоловые и тирозиновые остатки, металлы переменной валентности. Однако направление действия NO, изменяющего активность критических сигнальных белков, вовлеченных в канцерогенез, в значительной мере определяется концентрацией соединения [13, 14].

Известно, что NO в реакции с кислородом, а также свободными радикалами (O_2^- , $\bullet OH$) и металлами переменной валентности окисляется до NO_2 ($2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$), но при увеличении концентрации NO в среде, происходит быстрое образование других окислов азота – N_2O_3 и N_2O_4 ($NO_2 + NO \rightleftharpoons N_2O_3$; $NO_2 + NO_2 \rightleftharpoons N_2O_4$). N_2O_3 и N_2O_4 , $ONOO^-$ и нитриты проявляют нитрозирующие свойства (в условиях низких, физиологических и даже повышенных значений уровня pH) в реакциях с аминами и тиолами, что может приводить к образованию N-нитрозаминов и нитрозотиолов [13, 15–17]. Макрофаги, стимулированные липополисахаридами и цитокинами, также могут синтезировать N-нитрозамины [17]. С учетом собственных данных и данных литературы о существенном повышении биосинтеза опухолевой тканью соединений с нитрозирующими свойствами мы предположили возможность образования нитрозосоединений, в том числе канцерогенных N-нитрозаминов в самой опухоли. Таким образом, представляет научный и практический интерес изучение интенсивности биосинтеза соединений с нитрозирующими свойствами метаболитов NO, экспрессии фермента iNOS в опухолях на моделях опухолевого роста, отличающихся метастатическим потенциалом.

Задачи исследования:

- определить уровни эндогенного образования метаболитов NO – нитритов, нитратов и нитрозосоединений у мышей на разных моделях опухолевого роста;
- изучить в динамике биосинтез нитритов перитонеальными макрофагами у мышей с метастазирующей карциномой легких Льюиса;

- изучить в динамике экспрессию iNOS в опухолевой ткани и метастазах у мышей с карциномой легких Льюиса.

Материалы и методы

Работа проведена на мышах-самцах линий F_1 (CBA/Lac \times C57BL/6) (далее F_1 , $n = 140$), Balb/c ($n = 60$), F_1 (C57BL/6 \times DBA/2) (далее BDF, $n = 50$) и CBA/Lac ($n = 30$), полученных из питомника «Столбовая». Всех животных содержали на брикетированном корме при свободном доступе к воде. Штаммы опухоли карциномы Эрлиха и карциномы Льюиса получены из банка РОНЦ им. Н.Н. Блохина (использовали 2–3-и пассажи опухоли *in vivo*). Опухолевые клетки карциномы Эрлиха (10^6 клеток на мышь) перевивали подкожно в правую паховую область, а карциномы Льюиса (5×10^6 клеток на мышь) – в правую подмышечную область.

Биосинтез NO определяли по концентрации стабильных продуктов аэробного окисления NO – ионов NO_3^- и NO_2^- в опухолях – и по их выделению с мочой у мышей с перевиваемыми опухолями. Известно, что нитриты и нитраты являются конечными метаболитами NO и до 95 % их выводятся с мочой.

Сбор суточной мочи проводили до перевивки опухоли и после нее еженедельно в сроки, приведенные в табл. 1. Для этого мышей помещали по 5 штук в обменные клетки на сутки, лишив корма, при свободном доступе к дистиллированной воде.

Концентрацию нитритов и нитратов (с предварительным восстановлением нитратов до нитритов пористым кадмием) определяли спектрофотометрическим

Таблица 1. Выделение нитритов (NO_2^-) + нитратов (NO_3^-) с мочой в процессе роста карциномы Эрлиха у мышей линии Balb/c ($n = 10$) и карциномы легких Льюиса у мышей линии F_1 (CBA/Lac \times C57BL/6) ($n = 10$)

Сутки роста опухоли	Выделение $NO_2^- + NO_3^-$, моль/кг массы тела животного	
	Карцинома Эрлиха	Карцинома легких Льюиса
Контроль	$(1,10 \pm 0,44) \times 10^{-7}$	$(5,60 \pm 2,74) \times 10^{-7}$
3-и		$(2,44 \pm 1,22) \times 10^{-6*}$
4-е	$(4,45 \pm 3,29) \times 10^{-7*}$	
7-е		$(2,09 \pm 0,23) \times 10^{-6*}$
10-е	$(1,34 \pm 0,38) \times 10^{-6*}$	
14-е		$(3,78 \pm 1,83) \times 10^{-6*}$
17-е	$(3,88 \pm 1,41) \times 10^{-6*}$	
21-е		$(7,25 \pm 2,05) \times 10^{-7}$
24-е	$(4,10 \pm 0,73) \times 10^{-6*}$	
29-е		$(8,14 \pm 2,76) \times 10^{-7}$
32-е	$(7,0 \pm 3,63) \times 10^{-6*}$	

* Сравнение с контролем, $p < 0,01$.

методом с использованием реагента Грисса в опухолях, моче, перитонеальной жидкости [18]. Оптическую плотность окрашенных растворов определяли на спектрофотометре СФ-46. Концентрацию нитритов + нитратов в опухолевой ткани выражали в моль/кг ткани и в моль/кг массы тела животного (м.т.ж.), при расчете учитывали массу опухоли и массу животного на момент контроля. Для выделения опухолей мышей умерщвляли под эфирным наркозом.

Образование нитритов макрофагами и моноцитами определяли по содержанию в перитонеальной жидкости NO_2^- (моль) в расчете на 10^6 клеток на 7, 14, 21 и 29-е сутки роста карциномы Льюиса у мышей линии F_1 (табл. 2). Резидентные клетки перитонеальной жидкости получали промыванием брюшной полости раствором Хенкса в объеме 2 мл. Количество клеток в перитонеальной жидкости подсчитывали в камере Горяева, клеточный состав определяли по морфологическим критериям в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимза.

Таблица 2. Образование нитритов (NO_2^-) перитонеальными клетками (макрофагами + моноцитами) мышей линии F_1 (CBA/Lac \times C57BL/6) с перевиваемой карциномой легких Льюиса

Сутки роста опухоли	Количество макрофагов ($\times 10^3$) в 1 мкл	Количество NO_2^- на 10^6 клеток, моль
7-е	$1,32 \pm 0,23$	$(1,5 \pm 0,9) \times 10^{-7}$
14-е	$1,81 \pm 0,09^*$	Не обнаружено
21-е	$1,57 \pm 0,09^*$	$(6,0 \pm 3,0) \times 10^{-8}^{**}$
29-е (n = 6)	$2,0 \pm 0,26^*$	$(3,5 \pm 2,1) \times 10^{-7}$
Здоровые животные	$1,42 \pm 0,09$	$(1,8 \pm 0,46) \times 10^{-7}$

Примечание. В группах по 10 животных, кроме указанного значения n. * Сравнение с показателем для здоровых животных, $p < 0,01$.

Анализ содержания летучих N-нитрозаминов в образцах опухолевой ткани проводили методом, включающим перегонку исследуемых соединений с водяным паром, экстракцию из водного дистиллята дихлорметаном с последующей очисткой и концентрированием экстракта [19]. Идентификацию и количественное определение N-нитрозаминов осуществляли газохроматографическим методом с использованием термоэнергетического анализатора ТЕА-800 (Cambridge Scientific, Великобритания) с программным обеспечением для автоматической обработки данных Clarity.

Экспрессию iNOS определяли иммуногистохимическим методом в парафиновых микросрезках легких и опухолей, полученных от мышей с карциномой Льюиса [20]. Для выявления iNOS использовали поликлональные кроличьи антитела к iNOS (Santa Cruz Biotechnology, США), для предотвращения неспецифического связывания антител с опухолью применяли блокатор (Invitrogen, США) и дополнительно блокирующий пептид sc-649P (Santa Cruz Biotechnology, США). Препараты

изучали под световым микроскопом Biolam (Ломо, Россия).

Мы применяли комбинированную (количественную и качественную) оценку экспрессии iNOS в опухолевой ткани.

Количественная оценка. При окрашивании участка опухолевой ткани, который составляет менее 25 % общей площади среза, экспрессию iNOS считали отрицательной (0), 25–50 % – умеренной (1+), 50–75 % – сильной (2+), > 75 % – очень сильной (3+).

Качественная оценка. Интенсивность окрашивания опухолевой ткани, метастазов, ткани легких оценивали по следующим критериям: отсутствие окрашивания (0), слабая интенсивность окрашивания более 25 % опухолевой ткани (1+), средняя интенсивность окрашивания более 25 % опухолевой ткани (2+), сильная интенсивность окрашивания более 25 % опухолевой ткани (3+).

Выраженность экспрессии оценивали с учетом суммарного значения количественного и качественного показателей: отсутствие экспрессии считали при суммарном значении, равном 0 или 1, экспрессия была положительной при суммарном значении 2 (+), умеренной – при 3–4 (++) , сильной – при 5–6 (+++).

Проверку значимости различий между данными, представленными в таблицах как среднее значение \pm выборочное стандартное отклонение, выполняли с применением t-критерия Стьюдента. Гипотезу о наличии связи между показателями проверяли с помощью регрессионного анализа.

Результаты и обсуждение

Результаты определения концентрации нитритов и нитратов показали, что суммарное значение метаболитов в опухолях с ростом карциномы Эрлиха увеличивалось особенно интенсивно на 3-й неделе, достигая уровня $(7,80 \pm 2,57) \times 10^{-5}$ моль/кг опухоли, что в 10,7 раза ($p < 0,01$) выше аналогичного показателя, зарегистрированного на 7-е сутки (табл. 3). На терминальной стадии роста карциномы Эрлиха (28-е сутки) отмечали существенное снижение концентрации нитритов + нитратов в опухолевой ткани. При определении концентрации нитритов + нитратов, рассчитанной на кг м.т.ж., максимальное увеличение (в 39,9 раза ($p < 0,01$)) зарегистрировано на 3-й неделе роста опухоли по сравнению с показателем, отмеченным на 7-е сутки у мышей с карциномой Эрлиха (см. табл. 3). Оценка суммарного биосинтеза метаболитов NO по экскреции с мочой выявила увеличение их выделения в процессе роста карциномы Эрлиха у мышей линии Balb/c (см. табл. 1). Так, выделение нитритов + нитратов на 24-е сутки возросло в 37,3 раза ($p < 0,01$) по сравнению с показателем здоровых мышей ($(1,1 \pm 0,44) \times 10^{-7}$ моль/кг м.т.ж.) Средний объем опухоли за этот период увеличился в $44,7 \pm 10,6$ раза. Прослеживается положительная связь между объемом карциномы Эрлиха и уровнем суточного выделения нитритов + нитратов с мочой (коэффициент детерминации 0,99). Следует отметить, что

Таблица 3. Концентрация нитритов (NO_2^-) + нитратов (NO_3^-) в опухолях карциномы Эрлиха и карциномы легких Льюиса в разные сроки их роста у мышей линии F_1 (CBA/Lac \times C57BL/6) ($n = 10$)

Сутки роста опухоли	Карцинома Эрлиха			Карцинома легких Льюиса		
	Масса опухоли, г	Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, моль/кг опухоли	Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, моль/кг массы тела животного	Масса опухоли, г	Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, моль/кг опухоли	Концентрация $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, моль/кг массы тела животного
7-е	0,912 \pm 0,30	(7,30 \pm 3,49) $\times 10^{-6}$	(1,66 \pm 0,79) $\times 10^{-7}$	0,240 \pm 0,11	(3,60 \pm 0,46) $\times 10^{-5}$	(2,88 \pm 0,37) $\times 10^{-7}$
14-е	1,695 \pm 0,28	(1,73 \pm 0,76) $\times 10^{-5**}$	(7,33 \pm 3,22) $\times 10^{-7**}$	1,742 \pm 0,61	(1,96 \pm 0,54) $\times 10^{-5**}$	(1,14 \pm 0,31) $\times 10^{-6**}$
21-е	3,395 \pm 0,68	(7,80 \pm 2,57) $\times 10^{-5**}$	(6,63 \pm 2,18) $\times 10^{-6**}$	4,910 \pm 1,75	(1,09 \pm 0,29) $\times 10^{-5**}$	(1,78 \pm 0,47) $\times 10^{-6**}$
28-е	5,42 \pm 1,63	(2,05 \pm 1,44) $\times 10^{-5*}$	(2,78 \pm 1,95) $\times 10^{-6**}$	—	—	—
29-е	—	—	—	8,292 \pm 1,66	(6,92 \pm 3,92) $\times 10^{-6**}$	(4,87 \pm 2,76) $\times 10^{-7*}$

* $p < 0,05$. ** Сравнение с соответствующим показателем на 7-е сутки роста опухолей, $p < 0,01$.

нитраты являлись основной окисленной формой NO, обнаруживаемой как в опухолевой ткани, так и в моче.

Изменение концентраций нитритов + нитратов в процессе роста метастазирующей карциномы Льюиса у мышей линии F_1 имело свои особенности (см. табл. 3). Максимальная суммарная концентрация нитритов и нитратов в опухолевой ткани карциномы Льюиса, зарегистрированная на 7-е сутки, составила $(3,60 \pm 0,46) \times 10^{-5}$ моль/кг опухоли, в дальнейшем она снижалась. В то же время при расчете концентрации нитритов и нитратов, выраженной в моль/кг м.т.ж., этот показатель достигал максимального значения на 21-е сутки и в 6,2 раза превышал показатель, определяемый на 7-е сутки. Следует отметить, что расчет концентрации нитритов + нитратов на кг м.т.ж. позволяет учитывать влияние увеличения массы опухоли, продуцирующей NO. Определение биосинтеза метаболитов NO по экскреции с мочой выявило достоверный рост их выделения в 6,75 раза в контрольный срок 14-х суток у мышей линии F_1 с карциномой Льюиса (см. табл. 1).

В экспериментах на мышцах-самцах линии CBA/Lac, предрасположенных к образованию гепатом, повышенную $((3,73 \pm 1,87) \times 10^{-5}$ моль/кг м.т.ж.) экскрецию нитритов + нитратов с мочой обнаружили у 8-месячных мышей (период появления первых спонтанных опухолей). У 20-месячных мышей (91 % животных с опухолями) регистрировали снижение выделения не только по сравнению с 8-месячными, но и с 3-месячными мышцами в 4,6 и 2,1 раза соответственно.

В опытах на мышцах-самцах линии F_1 с индуцированными бенз(а)пиреном (в сумме 144 мкг на мышшь) опухолями различной локализации в возрасте 22 и 25 мес регистрировали достоверное увеличение экскреции нитритов + нитратов в 10 и 17 раз соответственно. Следует отметить, что выделение метаболитов у мышшей со спонтанными и индуцированными бенз(а)пиреном опухолями сопоставимо с аналогичным показателем у мышшей с перевиваемыми опухолями.

Оценивая используемые подходы анализа эндогенного синтеза нитритов + нитратов, основанные на

определении их концентрации в опухолевой ткани или экскреции с мочой, можно отметить наличие синхронности изменений показателей в первые 3 недели роста карциномы Эрлиха у мышшей различных линий (F_1 и Balb/c). Для карциномы Льюиса такой очевидной согласованности в результатах, полученных разными способами, нет, однако и здесь подтверждается нарушение регуляции биосинтеза NO при прогрессии опухоли. Необходимо отметить, что показатель биосинтеза, оцениваемый по экскреции метаболитов NO с мочой, является интегральным и включает также метаболиты NO, образовавшиеся другими типами клеток для поддержания жизненно важных физиологических процессов [1, 5]. Помимо этого, следует указать на возможность депонирования NO в виде динитрозильных железосерных комплексов, S-нитрозотиолов, S-нитрозогемоглобина (Hb-SNO), нитрозильных комплексов гемоглобина (HbNO) и других комплексов. Кроме того, количество NO, связанное в комплексах и молекулах, может превышать количество NO в форме нитритов и нитратов [21–23]. Также возможно восстановление нитритов до NO неэнзиматическим путем в условиях снижения уровня pH в опухолевой ткани, а также с помощью ферментов дыхательной цепи митохондрий, электронно-транспортной цепи эндоплазматического ретикулума и цитохрома P-450 микросом [24].

Известно, что NO – важный медиатор противоопухолевой защиты. Продуцируемый иммунными клетками (макрофагами и нейтрофилами) NO оказывает цитостатическое и цитотоксическое действия на опухолевые клетки различного гистогенеза и туморогенности [25].

Результаты определения активности резидентных перитонеальных макрофагов + моноцитов по образованию ими NO_2^- (моль на 10^6 клеток) показали существенное снижение концентрации NO_2^- в перитонеальной жидкости мышшей с карциномой Льюиса на 14-е и 21-е сутки роста опухоли. В эти сроки концентрация NO_2^- в перитонеальной жидкости либо не определялась, либо имела очень малые значения

(см. табл. 1). Можно полагать, что уменьшение продукции NO макрофагами может привести к снижению их цитотоксических свойств.

К настоящему времени выявлены органы (носоглотка, ротовая полость, желудок, пораженная гельминтами печень, инфицированный желчный пузырь, кишечник, инфицированный мочевого пузырь и инфицированное влагалище), в которых при определенных условиях возможно образование канцерогенных N-нитрозосоединений. В результате паразитарной или бактериальной инфекции, развития воспалительных процессов и возникновения активных форм азота (АФА), проявляющих нитрозирующую активность, возможно образование N-нитрозаминов и нитрозотиолов в условиях низких, физиологических и даже повышенных значений pH [26].

Газохроматографический анализ опухолей карциномы Эрлиха (рис. 1), выделенных у мышей-самцов ($n = 24$) линий F_1 и BDF на 14, 21, 28 и 35-е сутки выявил следующие соединения: N-нитрозодиметиламин (НДМА) и N-нитрозодиэтиламин (НДЭА). Отмечается выраженная вариабельность концентраций нитрозаминов в опухолях мышей линии F_1 , которая изменялась от 0,029 до 0,546 мкг/100 г ткани для НДМА, от 0,14 до 0,49 мкг/100 г ткани для НДЭА. На позднем сроке роста карциномы Эрлиха средняя концентрация НДМА в опухолях мышей линии BDF составила $0,165 \pm 0,148$ мкг/100 г, а НДЭА — $0,48 \pm 0,46$ мкг/100 г. В контрольных образцах мышечной ткани, полученной от мышей, нитрозамины не обнаружены (рис. 2).

Есть основания полагать, что увеличение биосинтеза метаболитов NO опухолью происходит, прежде всего, за счет активации iNOS, однако нельзя исключить участия других изоформ NOS, особенно эндотелиальной [27].

Иммуногистохимическое определение экспрессии iNOS в микросрезах опухолевой ткани карциномы Льюиса (рис. 3) показало, что фермент выявлялся в основном на участках, расположенных ближе к периферии опухоли и в клетках стромы на всех контролируемых сроках. При этом интенсивность иммуноокрашивания несколько уменьшалась на 2-й неделе, однако на терминальной стадии количество клеток, экспрессирующих фермент, увеличивалось, при этом окрашивание было менее выраженным. В целом экспрессию фермента в опухолевой ткани можно оценить как положительную (табл. 4).

В опухолевых клетках, метастазирующих в легкие (см. рис. 3), иммуноокрашивание отсутствовало, что может свидетельствовать о селекционном отборе мигрирующих в легкие опухолевых клеток с низкой активностью iNOS.

Таким образом, полученные данные отражают возможность образования метаболитов NO в опухолях различного гистогенеза. Суммарная среднеарифметическая концентрация $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в опухолевой ткани карциномы Эрлиха изменялась в интервале от 3,5

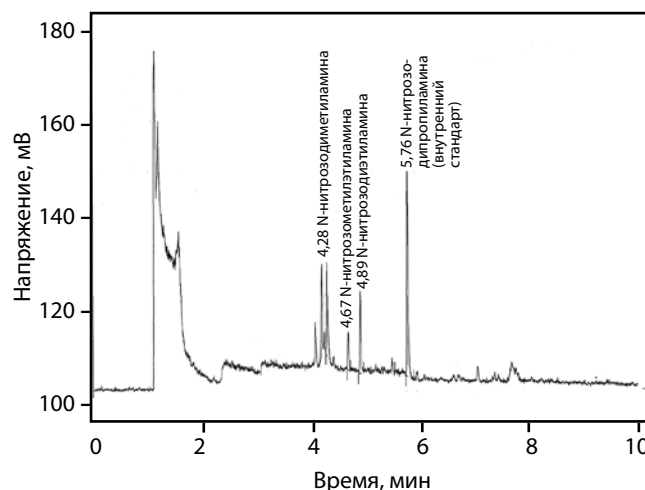


Рис. 1. Результаты анализа на содержание N-нитрозаминов в опухолях у мышей линии F_1 (CBA/Lac × C57BL/6) с карциномой Эрлиха (14-е сутки)

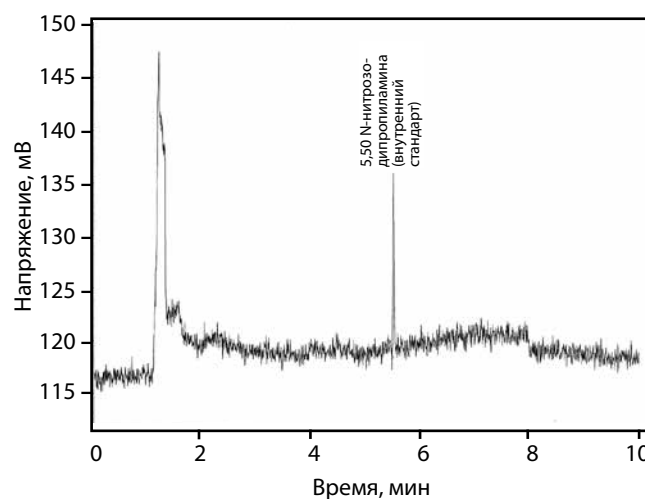


Рис. 2. Результаты анализа на содержание N-нитрозаминов в мышечной ткани мышей линии F_1 (C57BL/6 × DBA/2 с карциномой Эрлиха (контроль))

до 37,0 мкмоль (в эквиваленте NO), а в ткани карциномы Льюиса — от 3,3 до 17,0 мкмоль. С учетом неравномерной экспрессии iNOS в карциноме Льюиса можно полагать, что на отдельных участках локальная концентрация NO для этого типа опухоли может увеличиваться в 2–3 раза.

Как показали исследования на культуре опухолевых клеток молочной железы (MDA-MB-231 и MCF-7), низкие уровни концентрации NO (нмоль/л) увеличивают пролиферацию клеток через PI3K/pAkt и Raf/MEK/ERK 1/2 сигнальные каскады [14].

Активность ряда важных для канцерогенеза белков (HIF-1 α , p53, ERK) находили в зависимости от уровня концентрации NO в микроокружении опухолевых клеток MCF-7. При низких уровнях концентраций NO (< 50 нмоль) фосфорилируются ERK посредством гуанилатциклозависимого механизма. Аккумуляцию HIF-1 α наблюдали при средних уровнях концентрации

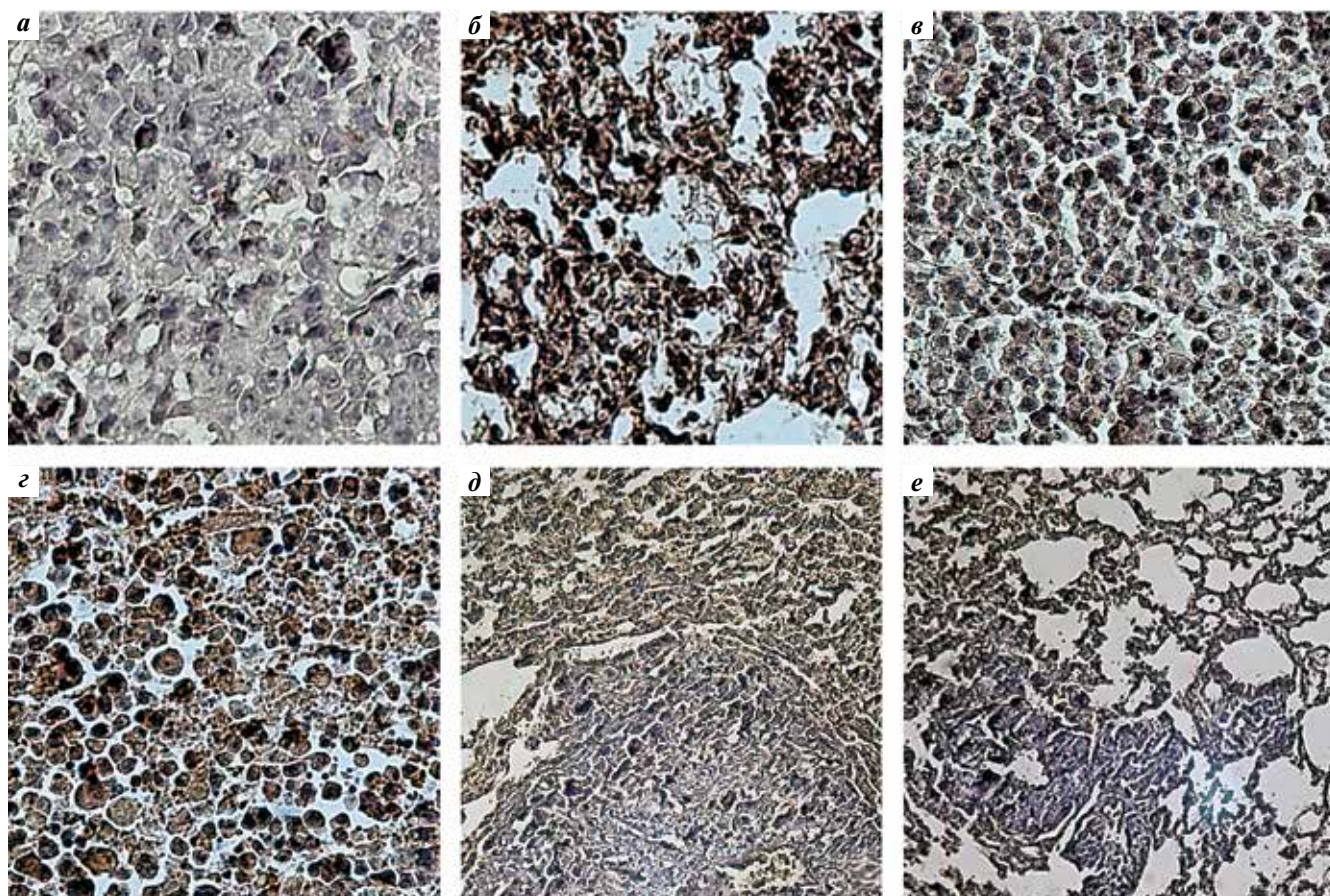


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление iNOS в микросрезах легких и опухолевой ткани карциномы легких Льюиса в разные сроки ее роста ($\times 400$, докрасивание гематоксилином): а – иммуногистохимическое выявление iNOS в опухолевой ткани без обработки антителами к ферменту, реакция отсутствует (7-е сутки); б – коричневое окрашивание свидетельствует о наличии iNOS в опухолевой ткани на 7-е сутки ее роста; в – иммуногистохимическое определение iNOS без обработки антителами к ферменту, низкая интенсивность окрашивания; г – положительная реакция умеренной интенсивности в микросрезах опухолевой ткани (21-е сутки); д, е – низкая интенсивность окрашивания метастазов опухоли в легкие (21-е сутки)

NO ($> 1,0 \times 10^{-7}$ моль), в то время как фосфорилирование серина p53-P-(ser-15) имело место при значительно более высоких уровнях ($> 3,0 \times 10^{-7}$ моль). Исследователи считают, что при достижении концентрации NO в тканях > 1 мкмоль создаются условия, классифицируемые как нитрозирующий стресс [12, 28]. При этом скорость реакций NO с O_2 увеличивается, что приводит к образованию более реакционных окислов азота с вы-

раженными нитрозирующими свойствами. Показано, что при концентрациях NO > 1 мкмоль нитрозировались критические белки, такие как PARP и каспазы [13].

Следовательно, в нашем случае при росте карциномы Льюиса на участках опухоли с выраженной экспрессией iNOS концентрация АФА иногда достигает уровней, характерных для нитрозирующего стресса. В этих условиях АФА могут инициировать апоптоз, повреждать ДНК, ингибировать митохондриальное дыхание, а также вызывать химическую модификацию белков, оказывая разнонаправленное действие на развитие опухоли.

NO проявляет себя как про-, так и антиметастатическое соединение, действие которого осуществляется через регуляцию сигнальных путей cGMP, COX-2, и оказывает влияние на активность матричных металлопротеиназ, интегринов в зависимости от экспозиции NO, типа клеток и т. д. [29]. Если принимать во внимание данные других авторов, можно прийти к заключению, что повышение уровня NO в первичной опухоли способствует ее прогрессии и метастазированию. Но в процессе диссеминации опухоли экспрессия iNOS в метастазирующих клетках большей частью по-

Таблица 4. Экспрессия iNOS при росте карциномы легких Льюиса у мышей линии F₁ (CBA/Lac \times C57BL/6)

Сутки роста опухоли	Опухолевая ткань	Строма	Легкие	Метастазы в легких
7-е	++	++	++	–
14-е	+	+	+	0
21-е	+	+	+	0
28-е	+	+	0	+

Примечание. «0» – отсутствие экспрессии; «+» – положительная экспрессия; «++» – умеренная экспрессия; «–» – экспрессию не определяли.

давлена [29]. Не противоречат этому выводу и данные исследования, выполненного ранее в Институте канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Авторы обнаружили, что низкотуморогенные и неметастазирующие клоны трансформированных эмбриональных клеток хомяка (STME) продуцировали значительное количество NO в ответ на индукцию макрофагами. Клетки со средней и высокой метастазирующей активностью, в отличие от неметастазирующих, демонстрировали низкую секрецию радикала [30]. Полученные в настоящей работе результаты отражают увеличение содержания iNOS в первичной опухоли и низкую экспрессию фермента в метастазах легких мышей с карциномой Льюиса и не расходятся с данными других исследователей [29].

Обнаружение в опухолевой ткани летучих нитрозаминов является еще одним непрямым индикатором образования реактивных форм азота: нитритов, N_2O_3 , ONOO⁻ и других форм, которые в реакции нитрозирования при взаимодействии со вторичными аминами могут образовать канцерогенные нитрозамины. Известно, что N-нитрозамины – сильные мутагены, которые алкилируют ДНК и проявляют высокую бластоогенную активность, причем установлено, что ни один вид подопытных животных не оказался резистентным к их действию [17, 26].

Образовавшийся в клетках NO имеет короткий полупериод жизни (6–10 с) и действует паракринно, в то время как более стабильные его метаболиты – нитриты и нитраты – в виде ионов циркулируют по всему организму с током крови и могут оказывать модулирующее влияние на многочисленные молекулы-мишени, в том числе на иммунные клетки и эритроциты. Так, в ранее проведенных нами исследованиях *in vitro* обнаружено снижение на 45,8–65,4 % ($p < 0,05$) образования активных форм кислорода стимулированными резидентными перитонеальными макрофагами и подавление на 11,2–76,4 % ($p < 0,05$) способности продуцировать активные формы кислорода аккумулярованными перитонеальными нейтрофилами при концентрациях нитритов в среде от 17,3 мкмоль до 2,73 ммоль. В условиях *in vivo* продолжительное поступление в организм мышей линии Balb/c нитрита натрия с водой в концентрации 500 мг/л оказывало иммуносупрессивное действие, проявляющееся в угнетении на 49 % лейкопоэза и снижении на 35 % фагоцитар-

ной активности стимулированных нейтрофилов крови у мышей [31].

Повышенная продукция нитритов в опухоли может способствовать образованию продуктов радикальной природы. Известно, что нитриты способны окислять оксигемоглобин до метгемоглобина с образованием супероксид анион-, нитрозильного и феррилгемоглобин-радикалов, а в условиях гипоксии взаимодействие дезоксигемоглобина (II) с нитритами приводит к образованию NO [32]. Способность нитритов индуцировать *in vitro* и *in vivo* образование радикальных соединений была подтверждена в выполненных нами ранее работах [33].

Интерес вызывают исследования, в которых показано, что нитриты оказывают потенцирующее действие на рост перевиваемых опухолей и канцерогенез, индуцированный химическими и биологическими факторами [34].

Приведенные данные указывают на то, что при действии на организм повышенных доз нитритов возможно снижение функциональной активности эффекторных клеток врожденного иммунитета и дополнительное образование высокорекреационных радикальных продуктов, что может неоднозначно влиять на рост опухолей.

Выводы

Рост опухолей различного гистогенеза сопровождается повышением образования в опухолях метаболитов NO – нитратов и нитритов, концентрация которых на отдельных участках опухоли достигает уровней, характерных для нитрозирующего стресса, что может вызвать разнонаправленное действие АФА на рост опухолей.

На стадии интенсивного роста перевиваемой карциномы Льюиса способность перитонеальных макрофагов + моноцитов генерировать нитриты подавляется, что может указывать на снижение их цитотоксических свойств.

Показана возможность образования в опухолях карциномы Эрлиха канцерогенных НДМА и НДЭА, способных повышать частоту мутаций в клетках.

В опухолевых клетках карциномы Льюиса на всех контролируемых сроках ее роста выявлена положительная экспрессия iNOS, в то время как в метастазах в легкие иммуноокрашивание отсутствовало, что может свидетельствовать о селекционном отборе мигрирующих в легкие клеток с низкой активностью iNOS.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ignarro L.J. Nitric oxide, second edition: biology and pathobiology. 2nd edn. Academic Press, 2009.
2. Wink D.A., Vodovotz Y., Laval J. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19(5): 711–21.
3. Cheng H., Wang L., Mollica M. et al. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett* 2014;353(1):1–7.
4. Hibbs J.B. Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol* 1991;142(7):565–9.

5. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота. М.: Вузовская книга, 2004. 360 с. [Granic V.G., Grigor'ev N.B. Nitrogen oxide. Moscow: Vuzovskaya kniga, 2004. 360 p. (In Russ.)].
6. Nathan C., Xie Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269(19):13725–8.
7. Melillo G., Musso T., Sica A. et al. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 1995;182(6):1683–93.
8. Mocellin S., Bronte V., Nitti D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev* 2006;27(3):317–52.
9. Xu W., Liu L.Z., Loizidou M. et al. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research* 2002;12(5–6):311–20.
10. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17(1):25–37.
11. Jones L.E. Jr., Ying J.L., Hofseth A.B. et al. Differential effects of reactive nitrogen species on DNA base excision repair initiated by the alkyladenine DNA glycosylase. *Carcinogenesis* 2009;30(12):2123–9.
12. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S. et al. The chemical biology of nitric oxide. implication in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;45(1):18–31.
13. Ridnour L.A., Thomas D.D., Mancardi D. et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 2004;385(1):1–10.
14. Pervin S., Singh R., Hernandez E. et al. Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway. *Cancer Res* 2007;67(1):289–99.
15. Недоспасов А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях. *Биохимия* 1998;63(76):881–904. [Nedospasov A.A. Biogenous NO in competitive relations. *Biokhimiya = Biochemistry* 1998;63(76):881–904. (In Russ.)].
16. Choudhari Sh.K., Chaudhary M., Bagde S. et al. Nitric oxide and cancer: a review. *Word J Oncol* 2013;11:118.
17. Preussmann R. Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance. *Naturwissenschaften* 1984;71(1):25–30.
18. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assay based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851(1–2):51–70.
19. Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах. Методические указания по методам контроля. МУК 4.4.1.011–93. [Determination of volatile N-nitrosamines in the food stock and foodstuffs. Methodology guidelines on control methods. МУК 4.4.1.011–93. (In Russ.)].
20. Vakkala M., Kahlos K., Lakari E. et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in *in situ* and invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2408–16.
21. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. *Вестник РАМН* 2000;(4):3–5. [Vanin A.F. Nitrogen oxide in biomedical studies. *Vestnik RAMN = RAMS Herald* 2000;(4):3–5. (In Russ.)].
22. Gaston B., Reilly J., Drazen J.M. et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(23):10957–61.
23. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимир Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемоглобинов. *Успехи биологической химии* 2007;47:259–92. [Osipov A.N., Borisenko G.G., Vladimirov Yu.A. Biological role of nitrosel hemoproteins' complexes. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Successes of Biological Chemistry* 2007;47:259–92. (In Russ.)].
24. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с. [Reutov V.P., Sorokina E.G., Okhotin V.E., Kositsyn N.S. Cyclic nitrogen oxide transformations in the organism of mammals. Moscow: Nauka, 1997. 156 p. (In Russ.)].
25. Hibbs J.B. Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumor and antimicrobial activity. *Res Immunol* 1991;142(7):565–9.
26. Bartsch H. N-nitroso compounds and human cancer: where do stand? *IARC Sci Publ* 1991;(105):1–10.
27. Muntane J., la Mata M.D. Nitric oxide and cancer. *World J Hepatol* 2010;2(9):337–44.
28. Thomas D.D., Espey M.G., Ridnour L.A. et al. Hypoxic inducible factor 1alpha, extra-cellular signal-regulated kinase, and p-53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(24):8894–9.
29. Cheng H., Wang L., Mollica M. et al. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett* 2014;353(1):1–7.
30. Burdelya L.G., Grosheva I.A., Dyakova N.A., Deichman G.I. Nonactivated macrophage-induced nitric oxide production by tumor cells differing in tumorigenic and spontaneous metastatic activities. *Tumor Biol* 1998;19:346–55.
31. Дерягина В.П., Машковцев Ю.В., Ильницкий А.П. Экспериментальное изучение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов в условиях воздействия нитрита натрия. *Биомедицинская химия* 2003;49(1):19–26. [Deryagina V.P., Mashkovtsev Yu.V., Il'nitskiy A.P. Experimental studies of the functional activity of neutrophils and macrophages, influenced by the sodium nitrite. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry* 2003;49(1):19–26. (In Russ.)].
32. Степуро И.И., Чайковская Н.А., Солодунов А.А., Арцукевич А.Н. Образование NO в процессе окисления ферроформ гемоглобина нитритом. *Биохимия* 1997;62(9):1122–9. [Stepuro I.I., Chaykovskaya N.A., Solodunov A.A., Artsukevich A.N. NO formation in the process of nitrite oxidation of hemoglobin ferroforms. *Biokhimiya = Biochemistry* 1997;62(9):1122–9. (In Russ.)].
33. Дерягина В.П. Образование свободнорадикальных соединений при действии нитрита натрия на организм животных и в условиях *in vitro*. *Токсикологический вестник* 2003;(6):20–5. [Deryagina V.P. Formation of free radical compounds under the influence of the sodium nitrite on animals' organism and in *in vitro* conditions. *Toksikologicheskii vestnik = Toxicologic Herald* 2003;(6):20–5. (In Russ.)].
34. Ильницкий А.П., Реутов В.П., Рыжова Н.И. и др. Модифицирующее действие нитритов на легочный blastomogenez и вирусный лейкозогенез у мышей: возможная роль окиси и двуокиси азота. *Вестник РАМН* 2000;(7):11–6. [Il'nitskiy A.P., Reutov V.P., Ryzhova N.I. et al. Modifying nitrites' influence on the pulmonary blastomogenez and viral leucogenesis at mice: possible role of the nitrogen oxide and nitrogen dioxide. *Vestnik RAMN = Herald RAMS* 2000;(7):11–6. (In Russ.)].

Генетические изменения в линии Pчоч1-КК светлоклеточного рака почки человека

А.А. Лушникова¹, Л.Ф. Морозова¹, И.С. Абрамов², Т.С. Дубровина¹, А.В. Балбуцкий¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Анна Александровна Лушникова LAN21@yandex.ru

Перевиваемая клеточная линия Pчоч1-КК из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина относится к подтипу светлоклеточного рака почки и может использоваться для исследования механизмов канцерогенеза, а также определения молекулярных мишеней таргетной терапии. **Цель исследования** — анализ генетических изменений в стабильной культуре клеток Pчоч1-КК для характеристики этой модельной линии.

Результаты. Изменения в генах VHL (экзоны 1, 2 и 3) и TP53 (экзоны 6–10) идентифицировали путем амплификации геномной ДНК с последующим фрагментным анализом продуктов полимеразной цепной реакции и прямым секвенированием по Сэнгеру. Выявлена протяженная делеция в экзоне 1 гена VHL в сочетании с мутацией в экзоне 7 и 2 полиморфизмами в экзоне 4 гена TP53. Такие сопряженные нарушения в генах-супрессорах могут быть одной из причин агрессивного роста опухоли и ее резистентности к стандартной терапии.

Ключевые слова: светлоклеточный рак почки, культура клеток Pчоч1-КК, ген-супрессор VHL, ген-супрессор TP53, мутация

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-81–85

Genetic alterations in the human kidney clear cell carcinoma line Pчоч1-КК

A.A. Lushnikova¹, L.F. Morozova¹, I.S. Abramov², T.S. Dubrovina¹, A.V. Balbutskiy¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Reseach Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; 3 Vavilova St., Moscow, 119991, Russia

Continuous cell line Pчоч1-КК from the collection of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center refers to the kidney clear cell carcinoma subtype. It is useful for study of carcinogenesis and molecular targets for targeted therapy.

Objective. Analysis of the genetic alterations in a stable cell culture Pчоч1-КК to characterize this model cell line.

Results. Alterations in VHL (exons 1, 2 and 3) and TP53 genes (exons 6–10) were identified by amplification of genomic DNA followed by fragment analysis polymerase chain reaction and direct Sanger sequencing. An extended deletion in exon 1 in combination with mutation in exon 7 of VHL gene and 2 polymorphisms in exon 4 of TP53 gene were revealed. Such simultaneous alterations in 2 suppressor genes might be one of the causes of aggressive tumor growth and its resistance to standard therapy.

Key words: human kidney clear cell carcinoma, cell culture Pчоч1-КК, tumor suppressor gene VHL, tumor suppressor gene TP53, mutation

Введение

Рак почки (РП) занимает 3-е место среди опухолей мочеполовой системы по частоте встречаемости и 1-е по смертности. Ежегодно в мире регистрируют около 250 тыс., а в России — более 9 тыс. случаев заболевания РП в год [1]. Наиболее распространенный подтип РП — светлоклеточный рак почки (СРП), составляющий 60–85 % всех случаев этого заболевания. Для СРП характерны высокая молекулярно-генетическая гетерогенность, метастатическая активность и неблагоприятный прогноз. В опухолевых клетках больных СРП обнаружен целый спектр генетических нарушений, включая мутации, потерю гетерозиготности и аберрантное метилирование промоторных областей, а также патологические полиморфные варианты генов-супрессоров [2]. Генетический анализ местно-распространенного и метастатического РП позволяет решить

вопрос о применении таргетных препаратов и улучшить прогноз заболевания. Результативность таргетной терапии РП и прогноз заболевания зависят от спектра генетических нарушений в опухолевых клетках, поэтому молекулярно-генетическая характеристика РП имеет важное значение как для выбора терапии, так и для идентификации клинически значимых опухолевых маркеров.

Использование уже имеющихся маркеров для таргетной терапии РП в клинической практике затруднено из-за высокой гетерогенности заболевания, обусловленной поликлональностью опухолей. Спектр молекулярно-генетических изменений довольно широк и может варьировать даже в пределах одного и того же новообразования. Поэтому идентификация генетических нарушений в первичной опухоли не всегда соответствует прогнозу и терапии РП на более поздних

этапах болезни, и основным методом лечения по-прежнему остается хирургическое удаление опухоли.

Клеточные модели РП представляют большой интерес как для изучения механизмов канцерогенеза в целом, так и для воздействия молекулярно направленных препаратов на рост опухоли, в частности.

Цель исследования – характеристика генетических нарушений в клетках культивируемой линии СРП Рпоч1-КК.

Материалы и методы

Перевиваемая клеточная линия Рпоч1-КК была получена из опухолевого фрагмента Рпоч1 2-го пассажа, представленного в коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина [3]. Гистологическое исследование опухолевой ткани на первых 4 пассажах при трансплантации на бестимусных мышей выявило признаки трабекулярно-папиллярного светлоклеточного рака. Клетки выращивали в питательной среде RPMI1640/DMEM в соотношении 1:1 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, пирувата натрия, комплекса витаминов и аминокислот в разведении 1:1000 стандартных концентраций этих препаратов (ПанЭко, Россия).

Мутации генов *VHL* (экзоны 1, 2 и 3) и *TP53* (экзоны 6–10) идентифицировали путем амплификации геномной ДНК с последующим фрагментным анализом продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и прямым секвенированием по Сэнгеру. Геномную ДНК из 3-суточной культуры клеток Рпоч1-КК выделяли с помощью набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ИнтерЛабСервис, Россия) по инструкции производителя. В смесь для амплификации гена *VHL* методом ПЦР входило 5 мкл (20 нг) геномной ДНК; 2,5 Ед Taq-полимеразы; буфер, содержащий 3 мМ хлорида магния ($MgCl_2$); по 200 мкл каждого из 4 нуклеотидтрифосфатов; по 0,2 пМ прямого и обратного праймеров; стерильная деионизированная вода до конечного объема 25 мкл. После активации полимеразы при температуре 94 °С в течение 5 мин выполняли 35 циклов амплификации в следующем режиме: денатурация при тем-

пературе 94 °С 30 с, отжиг праймеров при температуре 57–62 °С 30 с, элонгация при температуре 72 °С 30 с, финальная элонгация 5 мин (см. таблицу). Минисеквенирование и детекцию генетических изменений в режиме фрагментного анализа проводили с помощью оборудования AATI Fragment Analyzer с использованием набора реагентов DNF-910 dsDNA Reagent Kit 35-1500bp, позволяющего разделять фрагменты длиной от 35 п. н. до 1500 п. о. с допустимой погрешностью 5 п. н. Полученные данные обрабатывали с помощью программы PROSize 2.0.

Для амплификации экзонов 6–10 гена *TP53* с последующим прямым секвенированием ПЦР-продуктов использовали праймеры коммерческой NGS-панели SeqPlate *TP53* компании Tib Molbiol [4].

Результаты и обсуждение

Около 2 % больных РП страдают наследственным синдромом Хиппеля–Линдау – аутосомным заболеванием, которое обусловлено инактивацией гена-супрессора *VHL* вследствие герминальных мутаций. Инактивация этого гена и/или aberrантное метилирование промотора и потеря гетерозиготности обнаружены у 54 % российских пациентов уже на I стадии СРП. У больных СРП с метастазами на момент постановки диагноза выявлены аллельные делеции 2 или более других генов-супрессоров, локализованных на хромосоме 3p [5]. Молекулярные нарушения гена *VHL* характерны именно для СРП, но не для более редких папиллярного, хромофобного и других подтипов РП. Мутации и aberrантное метилирование гена *VHL* выявлены в 45,3 % (87 из 192) исследованных образцов спорадического СРП. При этом вероятность метастазирования опухолей, несущих делеции хромосомы 3p и/или мутации гена *VHL*, очень высока [6].

Ген *VHL* локализован на хромосоме 3p25, содержит 3 экзона и кодирует полипептид, состоящий из 213 аминокислотных остатков (рис. 1).

Белок pVHL необходим для функционирования убиквитин-лигазного комплекса и деградации фактора 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α), индуцируемого гипоксией. Указанные выше изменения в гене приводят к ингибированию его экспрессии или синтезу дефектного белка. Показано, что *VHL*-ассоциированные изменения в опухоли при СРП влияют на клеточный метаболизм, секрецию, взаимодействие опухолевых клеток со стромой и Т-клеточный иммунный ответ [7, 8].

Анализ мутаций генов-супрессоров *VHL* и *TP53*. В результате фрагментного анализа экзона 1 гена *VHL* в клетках линии Рпоч1-КК был выявлен ПЦР-продукт длиной 290 п. н., тогда как в морфологически нормальной ткани длина этого фрагмента составляет 417–420 п. н. Таким образом, в опухолевых клетках имеется протяженная делеция гена *VHL* в экзоне 1 длиной 125 ± 5 п. н. (в пределах погрешности метода). Продукты амплификации экзонов 2 и 3 не отличались от нормы. Это указывает на возможную делецию участка хромосомы

Праймеры к гену *VHL* и условия полимеразной цепной реакции

Экзон	Последовательность праймеров 5' → 3'	Температура отжига, °С	Длина продукта полимеразной цепной реакции, п. о.
1	tggtctggatcgcggaggaat	61	416
	ggcttcagaccgtctatcg		
2	accggtgtggctctttaaacc	62	227
	tcaagtgtctatctgtacttac		
3	tgccactgaggatttggttttgc	57	250
	aaagctgagatgaacacagttaag		

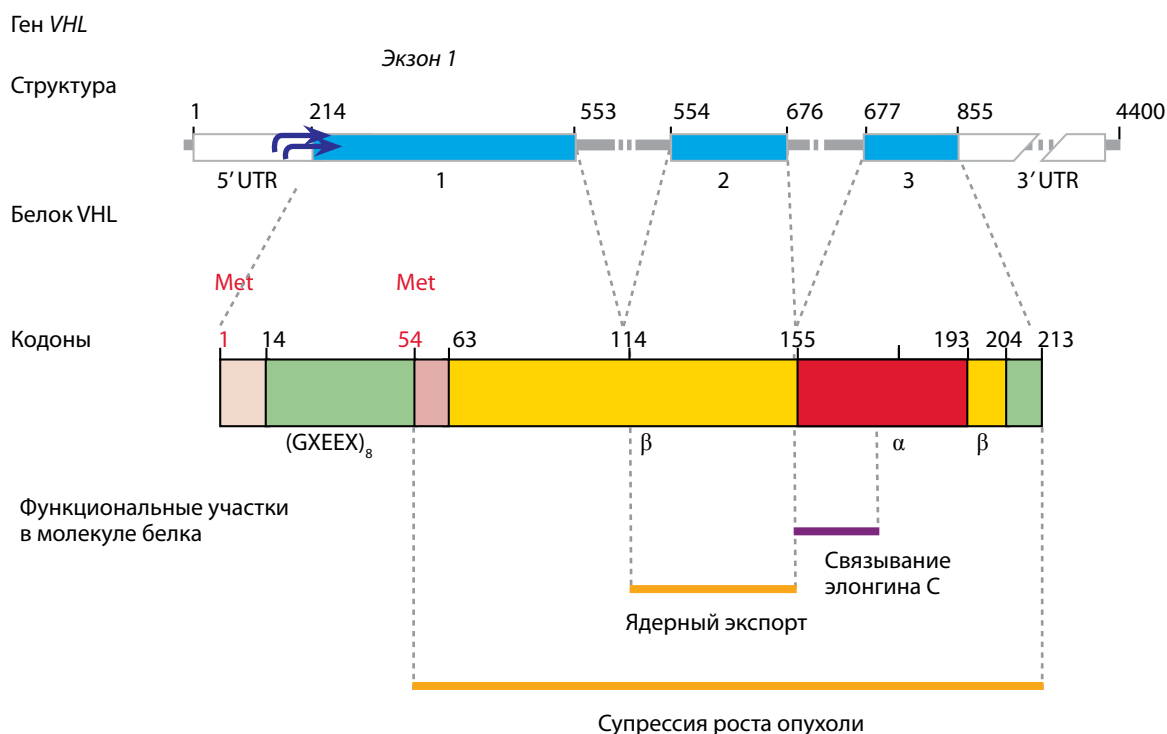


Рис. 1. Структура гена *VHL* и кодируемого им белка-супрессора *pVHL*. Цифрами обозначены нуклеотиды (ген) и кодоны (белок). Экзоны обозначены голубыми прямоугольниками. Дефектный белок *pVHL* не связывается с элонгином С, в результате чего нарушается элонгация мРНК

Зр, в котором локализован ген-супрессор роста опухоли *VHL*, играющий важную роль в неопластическом прогрессии.

Известно, что инактивация гена *VHL* играет ключевую роль в генезе как наследственных, так и спорадических форм СРП. По данным Д.С. Михайленко, соматические мутации гена *VHL* были обнаружены в 32,3 % случаев СРП и в 26,6 % образцов архивного или замороженного опухолевого материала с преобладанием изменений в экзонах 1 и 2. При этом подавляющее большинство (76,7 %) мутаций относились к делециям [5].

Утрата гена *VHL* нередко выявляется при СРП как раннее генетическое изменение, сопровождающееся последующей индукцией фактора HIF- α , поскольку продукт гена *VHL* — pVHL — ключевой компонент убиквитин-лигазного комплекса, регулирующего протеолиз этого фактора. Показано также, что в метафазе белок pVHL входит в состав centrosom и регулирует сигналинг, зависимый от рецептора эстрогена α (ER- α). Ингибирование этого сигнального пути критично для регуляции формирования микротрубочек и развития лекарственной устойчивости опухоли [9].

В результате ПЦП-анализа с последующим прямым секвенированием по Сэнгеру экзонов 6–10 гена *TP53* была обнаружена однонуклеотидная замена в экзоне 7 — с.742 C>T, приводящая к замене аргинина на триптофан Arg->Trp в кодоне 248. Эта патогенетическая мутация описана как герминальная (см. ссылку в базе данных BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs121912651 и ссылку NP_001119584–86.1:

р. Arg248Trp в базе HGVS). В базе данных Cosmic эта мутация гена *TP53* описана как соматическая: ENST00000420246> p.R248W/c.742C>T (см. ссылку <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=3388183>). Клетки Рпоч1-КК гомозиготны по указанной мутации (рис. 2).

Кроме того, в клетках изучаемой культуры в гомозиготном состоянии выявлены 2 полиморфизма: R72P — замена аргинина (R) на пролин (P) в кодоне 72, соответствующая нуклеотидной замене в экзоне 4 гена *TP53*, и IVS6+62G/A — G. Таким образом, в линии Рпоч1-КК СРП обнаружены мутации одновременно в 2 генах-супрессорах роста опухоли: *VHL* и *TP53*.

Показано, что молекулярные нарушения в гене *VHL*, скорее всего, относятся к ранним событиям канцерогенеза и чаще обнаруживаются у больных с I–II стадиями заболевания, чем с III–IV стадиями. У пациентов с инактивацией гена *VHL* достоверно чаще наблюдается отдаленное метастазирование РП в лимфатические узлы и печень: у 48,0 % пациентов — метастазы в лимфатические узлы и у 17 % — в печень; при отсутствии изменений в гене *VHL* метастазы в лимфатические узлы наблюдаются у 17 % пациентов, а в печень не обнаруживаются. Однако регуляция уровня экспрессии факторов роста, вовлеченных в ангиогенез и пролиферацию опухолевых клеток, зависит не только от активности сигнального пути АКТ/mTOR/HIF/VEGF/PDGF, но и от p53-зависимого сигналинга [10].

Синдром Ли–Фраумени, обусловленный мутациями в гене *TP53*, относится к редким наследственным патологиям. Тем не менее, соматические мутации, вы-

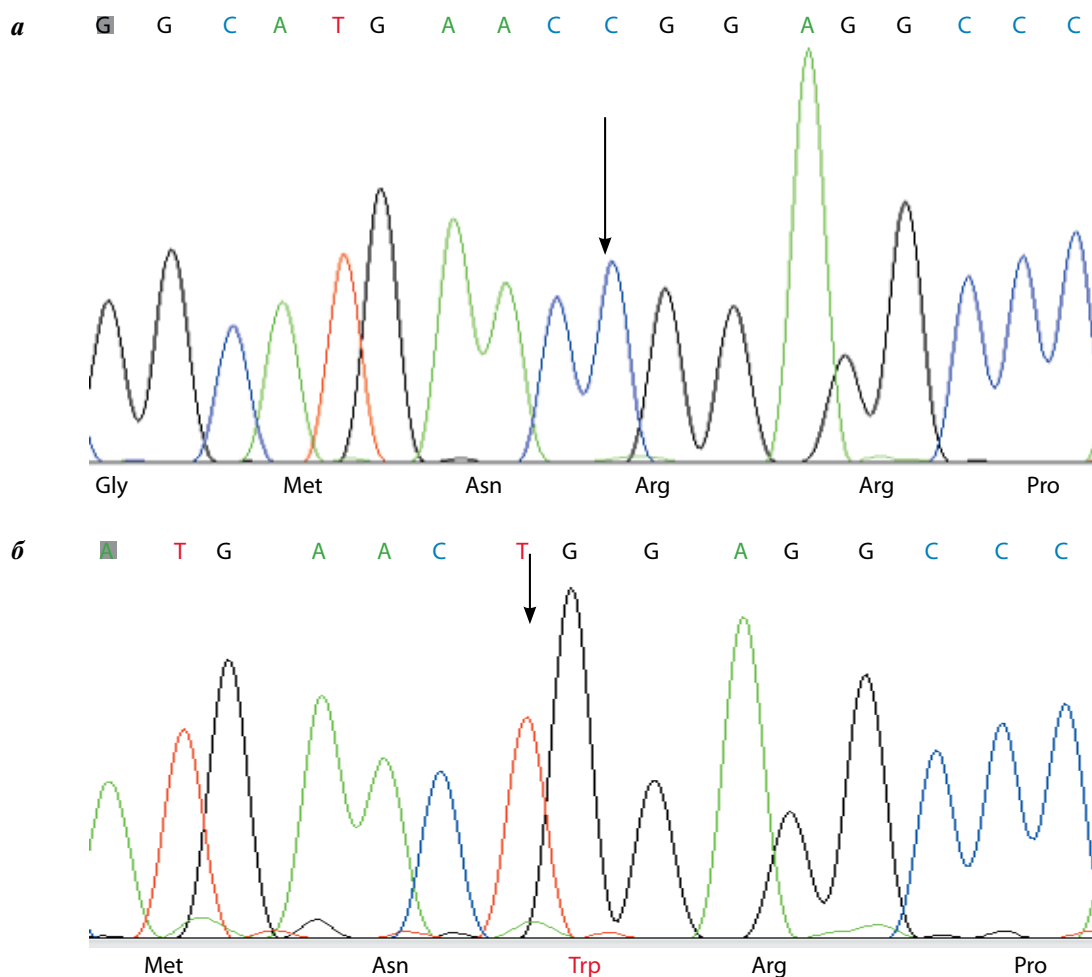


Рис. 2. Результаты прямого секвенирования экзона 7 гена *TP53*: а – фрагмент нуклеотидной последовательности экзона 7 гена *TP53* дикого типа, внизу показана кодируемая аминокислотная последовательность; б – мутация, выявленная в клетках Рпч1-КК. Стрелкой показан сайт с однонуклеотидной заменой с. 742С>Т в экзоне 7 гена *TP53*, приводящей к замене аргинина на триптофан в кодоне 248 – р. R248W

зывают утрату функции обоих аллелей гена *TP53*, – наиболее частые генетические изменения, наблюдаемые в спорадических опухолях. Мутации в гене *TP53* или делеция сегмента хромосомы 17р (участок p13.1), включающей ген *TP53*, характерны для таких онкологических заболеваний, как рак молочной железы, яичников, мочевого пузыря, шеи, пищевода, кожи, легких, глиобластома мозга, остеогенная саркома, гепатоклеточная карцинома, колоректальный рак.

Ген *TP53* дикого типа ингибирует транскрипцию генов, кодирующих белки, которые определяют множественную лекарственную устойчивость опухоли. Мутантный ген *TP53* повышает экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости и резистентность опухоли к терапии. Мутации гена *TP53* связаны с устойчивостью опухолевых клеток к препаратам на основе платины, а также с активацией онкогенов *FGFR3* и *HRAS* [11].

Помимо генетических данных, о плохом прогнозе РП могут свидетельствовать результаты иммуногистохимических исследований, которые позволяют обнаружить в клетках линии Рпч1-КК повышенную экспрессию онкогенов *sis*, *c-myc*, *myb* [3].

Заключение

Опухолевая гетерогенность РП – один из основных механизмов клональной эволюции и адаптации опухоли к меняющимся условиям микроокружения и поддержания ее злокачественного потенциала. Соотношение различных популяций опухолевых клеток в пределах одной опухоли и преобладание одного из клонов на определенном этапе канцерогенеза обуславливают уникальность биологии опухоли и ее резистентность к стандартной терапии [12]. Выявление хромосомных aberrаций в субклонах и анализ их дальнейшей эволюции в опухоли играют решающую роль в выборе адекватного лечения. Потенциальные мишени для воздействия молекулярно направленными препаратами – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), рецепторы к ростовым факторам (VGFR, PDGFR, EGFR, FGFR), сигнальный белок mTOR. Поиск новых молекулярных мишеней – актуальная проблема, которая требует дальнейших исследований на охарактеризованных клеточных моделях.

В клетках перевиваемой линии СРП мы обнаружили мутации одновременно в 2 генах-супрессорах роста

опухоли: протяженная делеция длиной 125 ± 5 п. н. в экзоне 1 гена *VHL*, нуклеотидная замена в экзоне 7 гена *TP53*, а также 2 полиморфизма в гомозиготном состоянии: R72P – замена аргинина (R) на пролин

(P) в кодоне 72 и IVS6+62G/A – G. Эти генетические изменения указывают на возможные причины агрессивного роста СРП и необходимость развития новых подходов к таргетной терапии РП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдова М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с. [Davydova M.I., Akseľ' E.M. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2012. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs, 2014. 226 p. (In Russ.)].
2. Михайленко Д.С., Попов А.М., Курьин Р.В. и др. Анализ молекулярно-генетических нарушений в генах *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* и *TP53* при светлоклеточном раке почки. Медицинская генетика 2008;(4):9–14. [Mikhaylenko D.S., Popov A.M., Kurynin R.V. et al. Analysis of molecular & genetic defects in *VHL*, *RASSF1*, *FHIT* and *TP53* genes at the clear cell adenocarcinoma. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2008;(4):9–14. (In Russ.)].
3. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред. М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009. С. 37–38. [Collection of human tumor strains. Ed. Davydov M.I. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2009. Pp. 37–38. (In Russ.)].
4. Lyubchenko L.N., Abramov I.S., Bateneva E.I. et al. DNA-diagnostics for inherited breast and/or ovarian cancer: standard approaches and novel technologies; Eur J Hum Gen 2014;22(1):243.
5. Михайленко Д.С. Анализ молекулярно-генетических нарушений, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований почки. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008. [Mikhaylenko D.S. Analysis of molecular & genetic defects, associated with the development of malignant kidney tumors. Author's abstract of thesis ... of candidate of medical sciences. Moscow, 2008. (In Russ.)].
6. Михайленко Д.С., Григорьева М.В., Землякова В.В. и др. Молекулярно-генетические нарушения в гене *VHL* и метилирование некоторых генов-супрессоров в спорадических светлоклеточных карциномах почки. Онкоурология 2010;(2):32–6. [Mikhaylenko D.S., Grigor'eva M.V., Zemlyakova V.V. et al. Molecular & genetic defects in *VHL* gene and methylation of some suppressing genes in sporadic clear cell kidney carcinomas. Onkourologiya = Cancer Urology 2010;(2):32–6. (In Russ.)].
7. Leisz S., Schulz K., Erb S. et al. Distinct von Hippel-Lindau gene and hypoxia-regulated alterations in gene and protein expression patterns of renal cell carcinoma and their effects on metabolism. Oncotarget 2015;6(13):11395–406.
8. Stehle F., Leisz S., Schulz K. et al. VHL-dependent alterations in the secretome of renal cell carcinoma: association with immune cell response. Oncotarget 2015;6(41):43420–37. PMID: 26486078.
9. Jung Y.S., Chun H.Y., Yoon M.H., Park B.J. Elevated estrogen receptor- α in VHL-deficient condition induces microtubule organizing center amplification via disruption of BRCA1/Rad51 interaction. Neoplasia 2014;16(12):1070–81. DOI: 10.1016/j.neo.2014.09.013.
10. Носов Д.А., Яковлева Е.С., Федянин М.Ю. и др. Прогностическое значение инактивирующих нарушений в гене *VHL* у больных метастатическим почечно-клеточным раком. Онкоурология 2011;(3):47–51. [Nosov D.A., Yakovleva E.S., Fedyanin M.Yu. et al. Prognostic value of desactivating defects in *VHL* gene at patients with metastatic renal cell carcinoma. Onkourologiya = Cancer Urology 2011;(3):47–51. (In Russ.)].
11. Alexiev B.A., Drachenberg C.B. Clear cell papillary renal cell carcinoma: incidence, morphological features, immunohistochemical profile, and biologic behavior: a single institution study. Pathol Res Pract 2014;210(4): 234–41.
12. Yates L.R., Campbell P.J. Evolution of cancer genome. Nat Rev Genet 2012;13(11):795–806.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Успехи молекулярной онкологии», следует руководствоваться **правилами**:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) на адрес: **adv.mol.onc@ronc.ru**.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, **его (их) полный адрес с указанием индекса**.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

В конце статьи должны быть обязательно приведены **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 страниц; мини-обзоры – не более 5 страниц; обзор литературы – не более 30 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском и английском языках, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений; **для оригинальных статей – структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т. д.)**. Объем резюме – не более 2000 знаков с пробелами. **Количество ключевых слов должно составлять от 3 до 10.**

4. Иллюстративный материал:

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими.

- Фотографии представляются в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате MS PowerPoint.

- Все рисунки должны быть пронумерованы. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписи к рисунку.

- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

- Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

- Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование не общепринятых сокращений не допускается.

- Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом:

- Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация – строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

- Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте).

- При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы. Например: Ornitz D.M., Xu J., Colvin J.S. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem 1996;271(25):15292–7.

- При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания. Например: Joël C.A. Fertility disturbances in men and women: a textbook with special reference to etiology, diagnosis and treatment. Basel: Karger, 1971.

- При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника. Например:

- Федянин М.Ю., Хмелькова Д.Н., Серебрянская Т.С. и др. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях. Злокачественные опухоли 2014;(4). [Fedyanin M.Yu., Khmelkova D.N., Serebriyskaya T.S. et al. Receptors of fibroblast growth factor at malignant tumours. Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumours 2014;(4). (In Russ.)].

- Доступно по: <http://www.malignanttumours.org/>. [Available at: <http://www.malignanttumours.org/>. (In Russ.)].

- Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).

- Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательнее **не более 30 источников**, в обзорах литературы – **не более 100**.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренном порядке.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

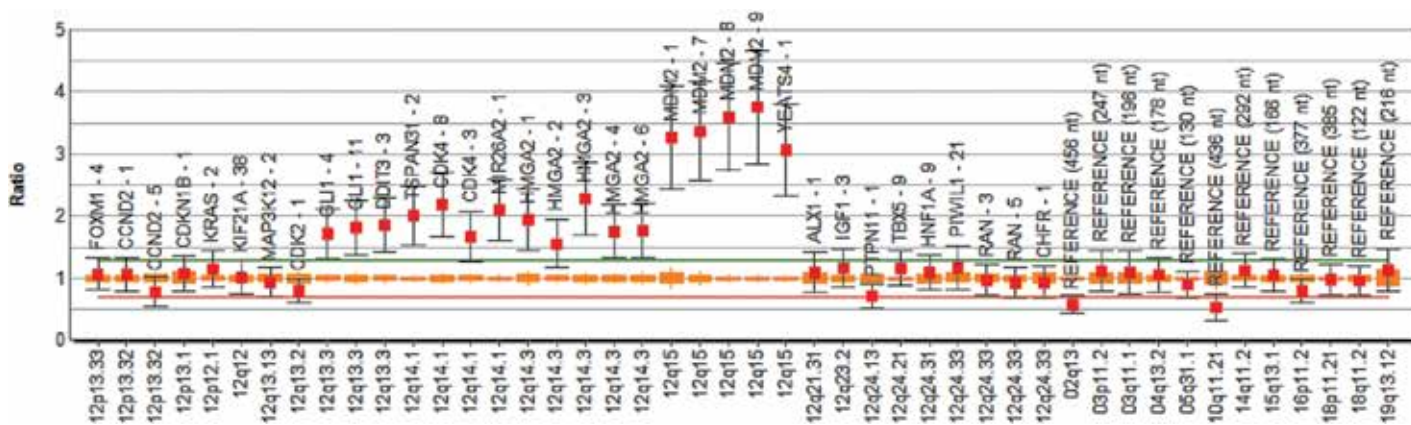
Молекулярные исследования в онкологии с использованием технологии MLPA®

(мультиплексная амплификация лигированных зондов)

- Наборы производства MRC-Holland (Нидерланды)
- Мультиплексная детекция изменения числа копий ДНК на уровне экзонов
- До 50 зондов к различным локусам в одной пробирке
- Дифференциация гетеро- и гомозиготных делеций/дупликаций, выявление амплификации локусов
- Детекция значимых точечных мутаций
- Определение профиля метилирования
- Минимальное количество исследуемого материала – 20 нг ДНК, в том числе частично деградировавшей (выделенной из парафиновых блоков)
- Использование стандартных моделей амплификаторов
- Детекция методом капиллярного электрофореза (фрагментный анализ)
- Автоматическая интерпретация с использованием интуитивно понятного программного обеспечения Coffalyser

Применения в молекулярной онкологии:

- Онкогематология
- Детекция семейных форм рака
- Анализ предрасположенности
- Характеризация опухолей
- Фармакогенетика



CDK4-HMGA2-MDM2: Умеренное увеличение копиюности региона 12q13.3-q14.3 (гены CDK4, HMGA2) и высокий уровень амплификации 12q15 региона (гены MDM2 и YEATS4) в ДНК, выделенной из парафиновых блоков ткани, полученной от пациента с липосаркомой (интерпретация данных электрофореза)

ЗАО «БиоХимМак»

119991 Москва, Ленинские горы,
МГУ им. М. В. Ломоносова

Тел. (495) 647-27-40, 939-24-21, e-mail: pcr@biochemmack.ru, www.biochemmack.ru



