

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

*МикроРНК: половые гормоны,
гормональный канцерогенез,
гормоночувствительность
опухолевой ткани*

*Перспективы терапевтического
воздействия на сигнальный путь FGFR*

*Роль транскрипционного фактора Ikaros
в нормальном гемопоэзе и лейкозогенезе:
биологические и клинические аспекты*

*Нейроэндокринные опухоли
пищеварительной системы:
морфологические
и молекулярные особенности*

*Биохимические маркеры
метастазирования в кости*

ТОМ 2 № 1
2015



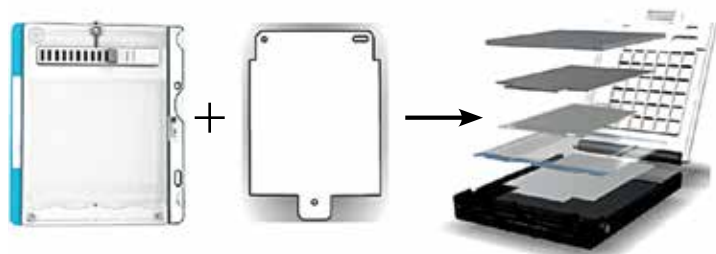
Amersham™ WB

Автоматизированный SDS-форез и Вестерн-блоттинг



Электрофорез
& Сканирование

Вестерн-блоттинг



Гель-карта

PVDF-карта



Постановка
эксперимента

Мониторинг
каждого
этапа

Оценка
результатов



- Amersham WB labeling buffer
- Amersham WB molecular weight markers
- Amersham WB loading buffer
- Amersham WB Cy5 labeling dye

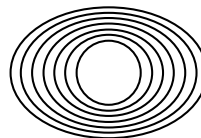
- ❖ Система Amersham WB – полностью интегрированная система для SDS-фореза и вестерн блоттинга, основанная на флуоресцентной детекции
- ❖ Программное обеспечение Amersham WB обеспечивает контроль за каждым этапом процесса, автоматизированный количественный анализ данных
- ❖ Электрофорез: 250-600 В, 20-50 мА (макс. 20 Вт на гель-карту)
- ❖ Сканирование:
 - Лазерный диод 635 нм (Cy5), 10 мВ
 - Лазерный диод 532 нм (Cy3), 10 мВ
 - Динамический диапазон – 4,6 порядков
 - 65 536 уровней, 16 бит (tif)
 - Автоматическая экспозиция
- ❖ Перенос: 10-100 В (макс. 400 мА, 40 Вт)
- ❖ Гибридизация: объем р-ра антител 5-12 мл
- ❖ Высушивание: 10 мин, макс. 45°C
- ❖ Набор готовых реагентов и расходных материалов для стандартизации протокола: Amersham WB Cy5 labeling kit, вторичные антитела, гель- и PVDF-карты
- ❖ Гель-карта: ПААГ 13.5% и 8–18%; загрузка – 14 образцов объемом 15-30 мкл
- ❖ PVDF-карта: мембрана PVDF для блоттинга
- ❖ Маркеры Amersham WB: 9 белков (10-225 кДа), меченных Cy3 и Cy5

ООО «ДжиИ Хэлскеа»



Пресненская наб, 10 С, этаж 12
Москва, 123317, Россия
Тел. +7 (495) 739-69-31
Факс +7 (495) 739-69-32
LSRus@ge.com

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
www.ronc.ru

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

М.А. Красильников, *д-р биол. наук, проф.*

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

И.Б. Зборовская, *канд. биол. наук,*

М.Г. Якубовская, *д-р мед. наук*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

М.В. Гудкова, *канд. биол. наук (отв. секретарь) (Москва)*

Г.А. Белицкий, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Л.М. Берштейн, *д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург)*

В.К. Боженко, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Н.А. Глушанкова, *д-р биол. наук (Москва)*

В.Э. Гуревич, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Е.Н. Имянитов, *д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург)*

Д.Б. Казанский, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

А.В. Карпукhin, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Ф.Л. Киселев, *д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

И.Ю. Кубасова, *канд. мед. наук (Москва)*

Н.Е. Кушлинский, *д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

Н.Л. Лазаревич, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

А.В. Лихтенштейн, *д-р биол. наук (Москва)*

Н.Н. Мазуренко, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Н.С. Сергеева, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

Е.В. Степанова, *д-р биол. наук (Москва)*

С.А. Тюлядин, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Е.М. Чевкина, *канд. биол. наук (Москва)*

Н.В. Чердынцева, *д-р биол. наук, проф. (Томск)*

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Ю. Барышников, *д-р мед. наук, проф. (Москва)*

Ю.М. Васильев, *д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

А.В. Гудков, *д-р биол. наук, проф. (Баффало, США)*

М.И. Давыдов, *д-р мед. наук, проф., акад. РАН (Москва)*

Д.Г. Заридзе, *д-р мед. наук, проф., чл.-корр. РАН (Москва)*

Б.П. Копнин, *д-р биол. наук, проф. (Москва)*

EDITOR-IN-CHIEF

M.A. Krasil'nikov, *PhD, DSc, Professor*

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

I.B. Zborovskaya, *PhD*

M.G. Yakubovskaya, *PhD, DSc*

EDITORIAL BOARD

M.V. Gudkova, *PhD (Executive Editor) (Moscow)*

G.A. Belitsky, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

L.M. Berstein, *PhD, DSc, Professor (Saint Petersburg)*

V.K. Bojenko, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

N.A. Gloushankova, *PhD, DSc (Moscow)*

V.E. Gurtsevitch, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.N. Imyanitov, *PhD, DSc, Professor (Saint Petersburg)*

D.B. Kazansky, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

A.V. Karpukhin, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

F.L. Kisseljov, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

I.Yu. Kubasova, *PhD (Moscow)*

N.E. Kushlinsky, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

N.L. Lazarevich, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

A.V. Lichtenstein, *PhD, DSc (Moscow)*

N.N. Mazurenko, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

N.S. Sergeeva, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.V. Stepanova, *PhD, DSc (Moscow)*

S.A. Tjulandin, *MD, PhD, DSc, Professor (Moscow)*

E.M. Tchekina, *PhD (Moscow)*

N.V. Tcherdyntseva, *PhD, DSc, Professor (Tomsk)*

EDITORIAL COMMITTEE

A.Yu. Baryshnikov, *PhD, DSc, Professor (Moscow)*

Yu.M. Vasiliev, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

A.V. Gudkov, *PhD, DSc, Professor (Buffalo, USA)*

M.I. Davydov, *MD, PhD, DSc, Academician of RAS, Professor (Moscow)*

D.G. Zaridze, *PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor (Moscow)*

B.P. Kopnin, *MD, PhD, DSc, Professor (Moscow)*

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

Учредители:

ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»,
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:

Москва, Каширское шоссе, д. 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза,
3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19

www.abvpress.ru

e-mail: abv@abvpress.ru

Статьи направлять по адресу:

e-mail: adv.mol.onc@tonc.ru

Заведующая редакцией В.Е. Ефремова
Корректор В.Д. Морозова

Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Служба рекламы С.Р. Аракелян
+7 (499) 929-96-19, dir@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
ПИ № ФС 77-57560 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.

Успехи молекулярной
онкологии. 2015. № 1. 1—90

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2015
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Группа Компаний Море»
Тираж 1000 экз.

1 ТОМ 2
'15

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

А. М. Малек, Л. М. Берштейн

МикроРНК: половые гормоны, гормональный канцерогенез, гормоночувствительность опухолевой ткани 4

О. С. Вишкова, А. Н. Мелешко

Роль транскрипционного фактора Ikaros в нормальном гемопоэзе и лейкогенезе: биологические и клинические аспекты 13

М. Ю. Федянин, Д. Н. Хмелькова, Т. С. Серебрянская, Т. А. Никольская, С. А. Тюляндин

Перспективы терапевтического воздействия на сигнальный путь FGFR 27

А. А. Ставровская, Г. П. Генс

Новое в изучении множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы 39

В. В. Делекторская

Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологические и молекулярные особенности 52

Н. В. Любимова, Н. Е. Кушлинский

Биохимические маркеры метастазирования в кости 61

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

С. В. Бойчук, А. Р. Галембикова, Б. Р. Рамазанов, А. Дусинг

Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам топоизомераз II типа 76

А. М. Стрижевская, Е. Г. Головня, А. З. Дзампаев, В. Н. Байкова

Биохимические критерии токсичности терапии высокими дозами метотрексата у детей с остеосаркомой 82

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ (ОБНОВЛЕННАЯ) 90

REVIEWS

A. V. Malek, L. M. Berstein

MicroRNA: sex steroids, hormonal carcinogenesis, hormonal sensitivity of tumor tissue. 4

V. S. Vshivkova, A. N. Meleshko

The role of Ikaros transcriptional factor in normal hematopoiesis and leukemogenesis: biological and clinical aspects. 13

M. Yu. Fedyanin, D. N. Khmelkova, T. S. Serebriyskaya, T. A. Nikolskaya, S. A. Tyulyandin

Prospects of therapeutic action on EGFR signaling pathway. 27

A. A. Stavrovskaya, G. P. Guens

News in the studies of multidrug resistance of breast cancer cells. 39

V. V. Delektorskaya

Neuroendocrine tumors of the digestive system: pathologic and molecular characteristics. 52

N. V. Lyubimova, N. E. Kushlinskiy

Biochemical markers of bone metastasis. 61

EXPERIMENTAL REPORTS

S. V. Boichuk, A. R. Galembikova, B. R. Ramazanov, A. Duensing

Imatinib enhances the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to topoisomerase II inhibitors. 76

A. M. Strizhevskaya, E. G. Golovnya, A. Z. Dzampaev, V. N. Baykova

Biochemical criteria of toxicity of therapy with high doses of methotrexate in children with osteosarcoma. 82

INFORMATION FOR AUTHORS (UPDATED). 90

МикроРНК: половые гормоны, гормональный канцерогенез, гормоночувствительность опухолевой ткани

А. М. Малек^{1,2}, Л. М. Берштейн¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова»; Россия, 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Половые гормоны, регулируя нормальные физиологические процессы большинства тканей и органов, традиционно считаются одним из ключевых факторов развития и прогрессии опухолей органов репродуктивной системы. В течение последних лет стала очевидной значимость системы посттранскрипционного контроля генной экспрессии, опосредуемой короткими одноцепочечными молекулами РНК, так называемыми микроРНК, в регуляции нормальных физиологических процессов и в патогенезе многих заболеваний, включая онкологические. В представленном обзоре обсуждается взаимосвязь между двумя в определенном смысле самостоятельными регуляторными системами — половыми гормонами и микроРНК. Взаимоотношения этих систем рассматриваются в контексте двух онкологических заболеваний — рака молочной железы (РМЖ) и рака предстательной железы (РПЖ). Кратко освещается история исследований роли половых гормонов в патогенезе РМЖ и РПЖ, более подробно представлены современные данные о биогенезе и биологической роли микроРНК. В клетках гормоночувствительных тканей половые гормоны регулируют работу микроРНК-аппарата регуляции генной экспрессии двумя известными путями: специфично, влияя на активность отдельных молекул микроРНК, и неспецифично, изменяя эффективность биогенеза микроРНК и активность цитоплазматического РНК-белкового комплекса. С учетом работы такой регуляторной сети существенно расширяются представления о биологических эффектах половых гормонов в физиологических условиях. Злокачественная трансформация приводит к искажению регуляторных эффектов половых гормонов, что отражается и усиливается регулируемой ими системой посттранскрипционного контроля генной экспрессии, опосредуемой микроРНК. К числу наиболее исследованных и клинически значимых примеров этого феномена относится утрата чувствительности к влиянию половых гормонов, на фоне чего клетки приобретают способность к активной пролиферации без гормональной стимуляции за счет подключения коллатеральных сигнальных путей и ростовых факторов. Этот феномен отчасти опосредуется микроРНК, и как следствие, к обсуждению привлекаются современные экспериментальные данные, указывающие на причастность микроРНК к формированию феномена гормональной резистентности клеток РМЖ и РПЖ. Представления о возможной первичной роли нарушений функций микроРНК в процессе опухолевой трансформации и искажения механизмов гормональной регуляции основаны на меньшем количестве проведенных и опубликованных исследований. В целом, в соответствии с основной биологической ролью микроРНК, их таргетное воздействие на функции половых гормонов в основном опосредуется взаимодействием с различными участками матричной РНК (мРНК) соответствующих гормональных рецепторов и ведет к угнетению синтеза последних. В итоге действие многих микроРНК конвергируется на одной молекуле мРНК, что в большинстве случаев приводит к подавлению сигнальных каскадов, индуцируемых половыми гормонами. Анализ фундаментальных аспектов дополнен обзором клинически значимых проблем, в решении которых должна учитываться взаимосвязь половых гормонов и микроРНК. Коротко обсуждаются перспективы развития и внедрения в клиническую практику методов диагностики, прогнозирования и оптимизации терапии опухолевых заболеваний гормоночувствительных тканей на основе сведений о микроРНК и их связях с обсуждаемыми проблемами.

Ключевые слова: микроРНК, половые гормоны, канцерогенез, эстрогены, прогестерон, андрогены, гормоночувствительность, гормональная резистентность, рак, рак предстательной железы, рак молочной железы

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.004–012

MicroRNA: sex steroids, hormonal carcinogenesis, hormonal sensitivity of tumor tissue

A. V. Malek^{1,2}, L. M. Bershtein¹

¹N. N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia;
68 Leningradskaya St., Pesochnyi, St. Petersburg, 197758, Russia;

²National Research Centre “Kurchatov Institute”, B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute;
Orlova roshcha, Gatchina, Leningrad region, 188300, Russia

Sex hormones, regulating normal physiological processes of most tissues and organs, are considered to be one of the key factors in the development and progression of the reproductive system cancer. Recently, the importance of the system for post-transcriptional control of gene expression mediated by short single-stranded RNA molecules (microRNA) became evident. This system is involved in regulation of normal physiological processes and in the pathogenesis of many diseases, including cancer. In review we discuss the relationship between the two regulatory systems — sex hormones and microRNAs. The relationship of these systems is considered in the context of two tumors — breast and prostate cancer. In particular, the history of research on the role of sex hormones in the pathogenesis of breast cancer and prostate cancer is briefly covered. Additionally, modern scientific data on the biogenesis and biological role of microRNAs are presented in more detail. In the cells of the hor-

hormone-sensitive tissues, sex hormones regulate the microRNA-mediated machinery of gene expression control by two known ways: specifically, affecting the activity of individual microRNA molecules and non-specifically by altering the efficiency of microRNA biogenesis and activity of RNA-induced silencing complex. This downstream regulatory network substantially enhances biological effects of sex hormones at physiological conditions. Malignant transformation leads to a distortion of the regulatory effects of sex hormones that crucially influence the system of microRNA-regulated post-transcriptional control of gene expression. The most established and clinically significant example of such phenomenon is the loss of sensitivity of cells to the regulatory action of these hormones. As a consequence, cancer cells acquire the ability to active proliferation without stimulation with sex hormones. This effect is partly mediated by microRNAs. Also, relevant experimental data indicating the involvement of microRNAs in the phenomenon of breast cancer and prostate cancer cells hormone resistance are discussed in the review.

Conception of the possible primary role of microRNAs in the process of malignant transformation and distortion of hormonal regulation is based on a smaller number of scientific reports. In general, in accordance with the main biological role of microRNAs, latter may affect sex hormones function via interaction with the mRNAs of hormone receptors and inhibition of their synthesis. As a result, the effect of many microRNA is converging on the single mRNA, results in suppression of corresponding protein function and, in the end, leads to inhibition of regulatory cascade downstream of sex steroids.

Finally, the analysis of the fundamental aspects of sex hormones — microRNA interplay is supplemented by brief overview of clinically significant problems. The prospects for development and introduction into clinical practice innovative methods of diagnosis, prediction and optimization of therapy of breast and prostate cancers are discussed as well.

Key words: microRNA, sex hormones, carcinogenesis, estrogens, progesterone, androgens, hormonal sensitivity, hormonal resistance, cancer, prostate cancer, breast cancer

Введение: половые гормоны и опухолевый рост

Половые гормоны (ПГ) в той или иной степени регулируют функции большинства тканей и органов, оказывая наиболее существенное влияние на клетки органов репродуктивной системы. Злокачественная трансформация этих клеток сопровождается нарушениями гормональной регуляции ключевых факторов клеточного гомеостаза: метаболического статуса, пролиферативной активности, генной экспрессии и других. Являются ли сдвиги гормональной регуляции независимым канцерогенным фактором или только следствием генетических аномалий в гормонозависимых клетках? Этот вопрос пока не имеет однозначного ответа, а возможно, он просто некорректен. Как минимум патогенетическая роль ПГ имеет исторические доказательства: хирургическая кастрация в качестве средства лечения рака молочной железы (РМЖ) (George Beatson, 1890) и рака предстательной железы (РПЖ) (Charles Huggins, 1941) практиковалась на протяжении многих лет. На начальных этапах тактика, направленная на устранение стимулирующего эффекта эстрогенов на клетки опухоли молочной железы (или андрогенов на клетки опухоли предстательной железы соответственно) формировалась отчасти эмпирически, что объясняет многие исходные неудачи. К настоящему времени представления о природе канцерогенного действия ПГ существенно расширились [1]. Описание ключевых этапов биосинтеза стероидов и молекулярных механизмов их внутриклеточных эффектов определило возможность создания ряда противоопухолевых фармакологических препаратов, направленно блокирующих стимулирующее действие половых стероидов [2].

Тем не менее, с учетом несомненных успехов, гормональная терапия опухолей гормонозависимых органов не всегда приводит к желаемым результатам. В большинстве случаев исходно гормоночувствитель-

ных опухолей постепенное прогрессирование заболевания сопровождается развитием резистентности к (анти-)гормональной терапии, т.е. формированием феномена относительной независимости клеток опухоли от гормональной стимуляции [2–4]. Причины и механизмы развития гормональной рефрактерности клеток, исходно находившихся под контролем половых стероидов, активно исследуются. Логичным кажется предположение о вовлечении в процесс других регуляторных систем, вторичное гормонозависимое или параллельное (гормоннезависимое) искажение работы которых может имитировать действие гормонов и/или обеспечивать независимость клеток от «внешней» гормональной стимуляции. Накопление данных о биологических функциях некодирующих РНК, в частности так называемых микроРНК (microRNA, miRNA), подготовило почву для исследования возможного влияния этой группы регуляторных молекул на внутриклеточные эффекты ПГ. Согласно результатам недавних исследований, взаимозависимые искажения регуляторных функций ПГ и профиля микроРНК играют значимую патогенетическую роль в развитии РМЖ и РПЖ [5–7].

МикроРНК: структура, биогенез, функции

МикроРНК — это короткая (20–24 нуклеотида) одноцепочечная молекула РНК, участвующая в процессе посттранскрипционной регуляции работы генов. В геноме млекопитающих микроРНК транскрибируются с определенных участков (генов) РНК-полимеразой II в виде длинных молекул, формирующих вторичные структуры типа петель или «шпильек». Такая молекула называется при-микроРНК (primary, pri-miRNA), и обычно в ее состав входят последовательности нескольких зрелых микроРНК (т.е. она имеет полицистронную структуру). В ядре при-микроРНК взаимодействует с так называемым микропроцессор-

ным комплексом, состоящим как минимум из 20 различных белковых молекул, включая РНКазу III (Drosha), ряд обязательных протеинов (DGCR8) и вспомогательных факторов. В результате работы этого ферментативного комплекса образуется несколько микроРНК-предшественников — пре-микроРНК (precursor miRNA, pre-miRNA), имеющих длину около 70 нуклеотидов и 2 комплементарных «плеча», формирующих «шпильку» [8]. Пре-микроРНК распознается транспортными белками (Exportin-5), которые транспортируют ее из ядра в цитоплазму. Там под действием РНКазы III (Dicer) происходит формирование коротких двухцепочечных РНК-фрагментов, так называемых малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siRNA). Эти молекулы обладают определенной устойчивостью к ферментативной деградации, и их синтетические аналоги часто используются в экспериментальных исследованиях процесса РНК-интерференции. В естественных условиях двухцепочечная РНК диссоциирует на две комплементарные молекулы микроРНК. Одна из них, зрелая микроРНК (guide strand), связывается с протеином из семейства Argonaute (AGO), включается в состав цитоплазматического РНК-белкового комплекса (RNA-induced silencing complex, RISC) и определяет таргетность его воздействия на молекулы матричной РНК (мРНК) в цитоплазме клетки [9]. Вторая молекула (passenger strand) обычно деградирует. Механизм формирования активного комплекса RISC привлекает к себе постоянное внимание [10]. Считается, что обе комплементарные молекулы микроРНК (их обозначают как р3 и р5) теоретически могут взаимодействовать с AGO, а основным фактором, определяющим выбор функциональной молекулы (guide strand), является термодинамическая асимметричность дуплекса [11].

В составе RISC зрелые молекулы микроРНК обеспечивают его специфическое взаимодействие с комплементарными участками мРНК, что ведет к блокаде трансляции или деградации мРНК. При этом одна молекула микроРНК может взаимодействовать с несколькими мРНК, что обеспечивает возможность ко-регуляции функциональных групп генов. К настоящему времени описано более 2500 различных микроРНК (miRBase: www.mirbase.org, версия 21). Предполагается, что под их контролем находится около 60 % всех протеин-кодирующих генов [12]. Искривление работы системы микроРНК-зависимого посттранскрипционного контроля генов, определяющих активность пролиферации и апоптотическую готовность [13], метаболический статус [14], взаимодействие с межклеточным матриксом и адгезивные характеристики [15], происходит в процессе злокачественной трансформации и усугубляется в ходе прогрессии опухоли.

Существенно при этом, что транскрипция при микроРНК, многоступенчатый внутриклеточный биогенез микроРНК и формирование микроРНК-со-

держивающего комплекса (RISC), в свою очередь, регулируются многими факторами, включая ПГ [6].

Воздействие эстрогенов на биогенез и функции микроРНК применительно к проблеме рака молочной железы

Рецепторы ПГ — эстрогенов (ER α , ER β), андрогенов (AR) и прогестерона (PR) входят в группу так называемых гормональных ядерных рецепторов (наряду с группами ассоциированных с метаболизмом и орфанных ядерных рецепторов). Стероидные рецепторы способны непосредственно взаимодействовать с определенными участками геномной ДНК и активировать/блокировать транскрипцию таргетных генов [16]. Аналогичным образом опосредуется и один из основных известных путей гормонозависимой регуляции транскрипции генов, кодирующих микроРНК [6]. Например, в экспериментальном исследовании было показано, что ER α активируют транскрипцию и биогенез ряда микроРНК (miR-18a, miR-19b, miR-20b). В физиологических условиях эти микроРНК ингибируют экспрессию ER α , т.е. формируют классическую «петлю» отрицательной обратной связи. Судя по тому, что уровень ER α -регулируемых микроРНК в клетках ER α -позитивного РМЖ выше, чем в клетках ER α -негативного рака [17], регуляторная «петля» более активна при наличии в клетке ER α . Этот феномен может иметь отношение к формированию состояния эстрогенной ауто- или парастимуляции клеток ER α -негативного РМЖ.

В другой работе была дана оценка эстроген-индуцированным параллельным изменениям профилей внутриклеточных микроРНК и мРНК в клетках РМЖ (линия MCF-7) [18]. Показано, что эстрадиол изменяет транскрипционную активность генов около трех десятков микроРНК, что на посттранскрипционном уровне потенциально изменяет экспрессию более тысячи протеин-кодирующих генов. В этом исследовании было также отмечено, что эстрадиол стимулирует экспрессию как проонкогенных (miR-21, miR-103, miR-107), так и онкосупрессорных (let-7 family, miR-98, miR-17-5p, miR-200) молекул, причем конечный биологический эффект действия эстрадиола на клетки РМЖ отчасти определяется балансом ER α и ER β . Еще одним примером является эстроген-зависимое подавление микроРНК 515-5p (miR-515-5p), которое сопровождается усилением пролиферативной активности клеток РМЖ [19]. В целом анализ опубликованных экспериментальных данных свидетельствует о разнонаправленных изменениях профиля микроРНК, индуцируемых эстрогенами, в клеточных линиях РМЖ, причем конечный эффект этих изменений определяется многими факторами и пока трудно предсказуем.

Влияние эстрогенов прослеживается и на этапах посттранскрипционного созревания микроРНК. При этом обнаруживаемые изменения обычно касаются не отдельных молекул микроРНК, а определенных этапов биогенеза внутриклеточных микроРНК в це-

лом. Так, ER α прямо взаимодействует с компонентами «микропроцессорного» комплекса в ядре клетки, ингибируя превращение при-микроРНК в пре-микроРНК [20]. Экспрессия Exportin-5 — транспортной молекулы, обеспечивающей перенос пре-микроРНК из ядра в цитоплазму, усиливается под действием эстрадиола и прогестерона [21]. Аналогичный эффект эти половые стероиды оказывают на цитоплазматическую РНКазу Dicer [21], причем экспрессия данного ключевого для биогенеза микроРНК фермента оказалась более высока в клетках ER α -позитивного РМЖ по сравнению с ER α -негативными клетками [22, 23].

Эстрадиол регулирует также экспрессию компонентов RISC, который обеспечивает функциональную активность зрелых микроРНК и определяет в целом эффективность работы системы посттранскрипционного контроля экспрессии генов. Наблюдается зависимость уровня экспрессии белков, входящих в состав RISC, от эстроген-рецепторного статуса клеток РМЖ [23, 24]. В целом очевидно наличие связи между эстрогенной стимуляцией и активностью системы посттранскрипционного контроля экспрессии генов в клетках РМЖ при участии микроРНК, хотя имеющиеся данные пока не позволяют определить направленность и конечный биологический эффект этого феномена.

Воздействие андрогенов на биогенез и функции микроРНК в рамках проблемы рака предстательной железы

В норме андрогены регулируют экспрессию микроРНК в ткани предстательной железы, благодаря чему контролируются многие структурные и функциональные особенности клеток простаты [25]. За последние годы проведен ряд исследований изменения профиля экспрессии микроРНК в клетках РПЖ [26–28], что позволило продемонстрировать роль микроРНК в опосредовании проканцерогенных эффектов андрогенов [29]. В частности, среди андроген-регулируемых микроРНК участие в поддержании опухолевого роста в клетках предстательной железы экспериментально доказано для miR-21 [30], miR-125b [31], miR-141 [29, 32], miR-27a [33]. Например, повышенный уровень miR-21 приводит к активации пролиферации клеток РПЖ как при сохраненной андрогенной стимуляции, так и после прекращения таковой [30]. Аналогичный эффект имела активация экспрессии miR-125b, причем андроген-независимая стимуляция пролиферации клеток РПЖ сопровождалась угнетением экспрессии проапоптотического фактора Bak1 [31]. В целом андрогены в клетках РПЖ стимулируют каскад микроРНК-опосредованных пробластомогенных реакций, которые могут продолжаться после прекращения андрогенной стимуляции и иметь непосредственное отношение к феномену гормонорезистентности при РПЖ.

Анализ ряда публикаций позволяет, как и в случае РМЖ и ER, предположить наличие так называемых регуляторных «петель», координирующих экспрессию AR

и андроген-зависимых микроРНК. Например, в работе S. Mishra et al. [34] описано снижение уровня miRNA-21 после блокады AR и его повышение — после стимуляции AR в нормальных и трансформированных клетках эпителия простаты. С другой стороны, введение в AR-негативные клетки РПЖ (линия PC-3) синтетической копии miRNA-21 активировало продукцию клетками AR (мРНК и белок) и позволяло наблюдать эффекты активации этих рецепторов (усиление синтеза простатспецифического антигена). Аналогичный феномен «взаимостимуляции» AR и miRNA-27a был описан в исследовании С. Е. Fletcher et al. [33]. В обоих случаях исследователи предполагали, что микроРНК стимулирует транскрипцию AR опосредованно — путем посттранскрипционного угнетения экспрессии факторов, ингибирующих синтез AR (miRNA-21/PTEN; miRNA-27a/PNB).

Логичным, хотя не подтвержденным клиническими данными предположением является участие описанных регуляторных «петель» в формировании феномена андрогенной аутоstimуляции клеток РПЖ при снижении уровня циркулирующего гормона. Этот феномен, опосредованный кофактором угнетения AR-транскрипции — прогибитуном (prohibitin, PNB), исследовался в качестве причины развития так называемой гормон-рефрактерной стадии РПЖ в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [35]. Авторы работы не исследовали роль микроРНК, но результаты проведенных ими экспериментов подкрепляют гипотетическую связь между AR-регулируемыми микроРНК, микроРНК-регулируемыми факторами контроля AR-транскрипции, ростом концентрации внутриклеточных AR и гормональной рефрактерностью РПЖ.

В контексте оценки роли андрогенной стимуляции микроРНК в процессе развития РПЖ следует отметить, что для формирования определенных опухолей-специфических признаков клеток необходимо совместное участие AR и микроРНК. Например, одновременная активация AR на фоне повышения уровня miR-21 приводит к резкому угнетению экспрессии рецепторов TGFBR2 (TGF β receptor II), тогда как действие лишь одного фактора (либо микроРНК, либо андрогена) не вызывает этого эффекта. В результате клетки РПЖ становятся резистентны к действию TGF β , что способствует поддержанию активной пролиферации [34]. Такой способ «двойного контроля» может и определять специфичность действия андрогенов на клетки РПЖ, и способствовать формированию опухолей-специфических характеристик клеток простаты.

Следствием андрогенной стимуляции является не только повышение уровня определенных внутриклеточных микроРНК, но и их секреция в составе экзосом во внеклеточное пространство. Например, андроген вызывает активацию экспрессии miR-141 в клетках РПЖ *in vitro* (LNCaP, VCaP) и *in vivo* [29]. С другой стороны, в ряде независимых исследований повышение уровня этой микроРНК было показано

в плазме больных РПЖ [36, 37]. С учетом роли экзосомальной микроРНК в процессе опухолевой диссеминации [38], андроген-регулируемые сдвиги профиля экспрессии микроРНК клетками РПЖ могут иметь значение в процессе формирования отдаленных метастазов [39].

Углубленная оценка функциональной взаимосвязи андрогенов и микроРНК в клетках РПЖ дана в обзорной статье С. Е. Fletcher et al. [5], где приведен перечень 13 микроРНК, андроген-зависимость которых была показана в двух и более независимых исследованиях. С учетом общего количества известных микроРНК, относительно малое число достоверно вовлеченных в обсуждаемый процесс молекул говорит о том, что стимуляция AR в клетках РПЖ вызывает весьма характерные изменения микроРНК-профиля. Интересным представляется исследование W. Mo et al. [40], проследивших динамику изменений микроРНК-профиля после стимуляции клеток РПЖ дигидротестостероном, представляющим собой активный метаболит тестостерона. Оказалось, что существует два отчетливо определяемых «пика» флюктуации профиля микроРНК — через 1 ч и через 8 ч после воздействия гормона. Причем ограниченное число микроРНК «отвечало» сразу и только сразу, т.е. через 1 ч. МикроРНК, имеющие два «пика» стимуляции андрогеном, преобладали как среди активируемых, так и среди ингибируемых микроРНК. В то же время существенное число микроРНК реагировало лишь через 8 ч после воздействия андрогена, причем второй «пик» нередко был более отчетливо выраженным, чем первый. Следуя логике авторов, можно предположить, что первый «пик» обусловлен непосредственным эффектом AR на транскрипцию микроРНК генов. Соответственно, второй «пик» — это результат действия белков, трансляция которых была «скорректирована» молекулами микроРНК — мишенями первичной стимуляции. Экстраполяция этих наблюдений на клиническую ситуацию, где нет «точки» начала действия гормона, приводит к выводу о преобладании не прямых, а опосредованных реакций клеток РПЖ в ответ на действие андрогенов. То есть андроген-зависимые изменения профиля микроРНК в клетках РПЖ конкретного пациента, скорее всего, лишь отчасти определяются непосредственной активностью AR как ядерного рецептора, причем даже с учетом существования набора коактиваторов и корепрессоров AR-опосредуемой транскрипции (см. ниже и [41]). Существенное значение могут иметь «вторичные», «третичные» и т.д. регуляторные эффекты андрогенов, в значительной степени опосредованные микроРНК.

Кроме специфической стимуляции/ингибирования отдельных молекул микроРНК, андрогены оказывают определенное влияние на биогенез микроРНК в целом. Так, активность некоторых компонентов «микропроцессорного» ядерного комплекса (РНказы III Drosha, p68) регулируется андрогенами [33, 42]. Инте-

ресно, что активность одного из основных ферментов микроРНК-процессинга — РНказы III Drosha — активируется AR в клетках РПЖ [33], но ингибируется ER α в клетках РМЖ [20], что, несмотря на определенное сходство [2], свидетельствует и о несомненных различиях между гормон-опосредованными процессами, лежащими в основе этих двух онкологических заболеваний. В целом, как и применительно к роли ER в случае РМЖ, представленные в литературе данные о гормональной регуляции биогенеза микроРНК и активности микроРНК-содержащего комплекса RISC многочисленны, но разнородны. Пока трудно точно определить, какой конечный функциональный эффект (активация или угнетение) оказывают андрогены на аппарат посттранскрипционной регуляции экспрессии генов в клетках РПЖ.

Роль микроРНК в регуляции половых гормонов и функционирования их рецепторов

Выше рассматривались эффекты, которые оказывают ПГ на профиль экспрессии и биогенез микроРНК. Как отмечалось, специфическое регуляторное воздействие ПГ имеет дивергентный характер, так как опосредуется взаимодействием одной рецепторной молекулы (ER α , ER β или AR) с промоторными регионами многих микроРНК генов. Кроме того, такое взаимодействие может как активировать, так и подавлять транскрипцию микроРНК генов. В соответствии с основной биологической ролью микроРНК их таргетное воздействие на функции ПГ опосредуется взаимодействием с различными участками мРНК соответствующих гормональных рецепторов и ведет к угнетению их синтеза. В итоге действие многих микроРНК конвергируется на одной молекуле мРНК (ER α , ER β или AR) и в большинстве случаев приводит к подавлению сигнального каскада, индуцируемого ПГ.

В данном отношении заслуживает внимания оригинальная методика (protein lysate microarray technology), позволившая определить взаимодействующие пары микроРНК–мРНК и оценить их функциональный эффект. С помощью этой технологии, разработанной сотрудниками Университета Турку под руководством проф. Olli Kallioniemi, были получены наиболее полные данные о спектре молекул микроРНК, непосредственно взаимодействующих с мРНК и ингибирующих синтез рецепторов ПГ — ER α [43] и AR [44]. Основные результаты были дополнены рядом исследований, выполненных традиционными методами и сфокусированных на отдельных молекулах микроРНК. В табл. 1 перечислены микроРНК, регулирующие на посттранскрипционном уровне экспрессию ER α . В представленном списке лишь одна молекула, miR-27a, активирует экспрессию гена ER α . Этот эффект не является результатом взаимодействия miR-27a с мРНК, а опосредуется цепочкой ядерных факторов (ZBTB10, Sp1, Sp4) [45, 46].

Таблица 1. МикроРНК, регулирующие активность ERα

МикроРНК	Изменение активности рецептора	Источник
let-7	↓	[47]
miR-9	↓	[43]
miR-22	↓	[43, 48]
pri-miR-17-92 (miR-18a, miR-19b, miR-20b)	↓	[17, 43]
miR-27a	↑	[45, 46]
miR-93	↓	[43]
miR-130a/b	↓	[43]
miR-145	↓	[49]
miR-181a/c/d	↓	[43]
miR-193b	↓	[43]
miR-206	↓	[43, 50, 51]
miR-219	↓	[43]
miR-221–222	↓	[43, 52]
miR-301	↓	[43]
miR-302c	↓	[43]
miR-372	↓	[43]
miR-373	↓	[43]
miR-517a/c	↓	[43]

Согласно многолетним клиническим наблюдениям, активация ERα стимулирует пролиферацию клеток РМЖ. Есть основания предполагать, что конечный эффект действия большинства микроРНК, угнетающих экспрессию ERα, будет иметь противоопухолевый характер. Большинство экспериментальных исследований подтверждают эту гипотезу, открывая перспективы разработки новых противоопухолевых средств на основе микроРНК. Тем не менее имеются и исключения из этого «правила», помимо уже упомянутой miR-27a. Как обсуждалось ранее, одна молекула микроРНК может ингибировать сразу несколько мРНК, причем конечный эффект такого мультитаргетного воздействия может отличаться от последствий угнетения синтеза лишь ERα. Например, miR-221–222, кроме взаимодействия с мРНК ERα, параллельно ингибируют экспрессию FOXO3 и BIM. С учетом онкосупрессорных функций этих молекул, конечным эффектом действия miR-221–222 на клетки РМЖ оказывается усиление пролиферации [53].

Стабильность молекулы мРНК AR также находится под контролем микроРНК. В табл. 2 перечислены микроРНК, непосредственно взаимодействующие с AR мРНК, и несколько микроРНК, взаимоотношения которых с AR носят опосредованный характер. Как и в случае РМЖ, все представленные в табл. 2 ми-

кроРНК (за исключением miR-27a) прямо или косвенно угнетают активность AR, что может указывать на вероятность терапевтического применения этих молекул.

Таблица 2. МикроРНК, регулирующие активность AR

МикроРНК	Изменение активности рецептора	Источник
let-7c (косвенно, через c-Мyc)	↓	[54]
miR-9	↓	[44]
miR-34	↓	[44, 55]
miR-17-5p (косвенно, через p300/CBP)	↓	[56]
miR-27a (косвенно, через PNB)	↑	[33]
miR-124	↓	[57]
miR-135b	↓	[44]
miR-141 (косвенно, через SHP)	↓	[32]
miR-185	↓	[44, 58]
miR-205	↓	[59]
miR-297	↓	[44]
miR-299-3p	↓	[44]
miR-331-3p (косвенно, через ErbB2)	↓	[60]
miR-371-3p	↓	[44]
miR-421	↓	[44]
miR-449a/b	↓	[44]
miR-488	↓	[61]
miR-634	↓	[44]
miR-654-5p	↓	[44]

В дополнение к описанным выше механизмам взаиморегуляции микроРНК и ПГ, следует упомянуть несколько работ, в которых исследовались функции так называемых РНК-активаторов стероидных рецепторов (steroid receptor RNA activator, SRA) [62, 63]. Это класс «не протеин-кодирующих» РНК, которые регулируют транскрипционную активность ядерных рецепторов, в частности ER и AR. С другой стороны, недавние исследования показали, что компоненты RISC (PACT, TRBP, Dicer) непосредственно взаимодействуют не только с микроРНК, но и с регуляторными ядерными РНК — SRA [64]. На основе пока ограниченных данных можно предполагать, что компоненты RISC в комплексе с микроРНК могут ингибировать синтез рецепторов ПГ в цитоплазме клетки, но в комплексе с РНК типа SRA способны повышать

транскрипционную активность ПГ в ядре. Эти исследования указывают на многокомпонентный и многоуровневый характер взаимосвязи двух регуляторных систем: стероидных гормонов и регуляторных РНК, что имеет прямое отношение не только к процессам физиологического характера, но и к проблеме опухолевого роста.

МикроРНК и гормонорезистентность карцином молочной и предстательной желез

Естественная история (или natural history, как принято выражаться в последнее десятилетие) этих двух заболеваний приводит к тому, что в определенном смысле изначально, а чаще в процессе лечебных мероприятий опухолевый процесс переходит в состояние нечувствительности (резистентности) к гормонотерапии. Современная литература дает немало примеров вовлечения микроРНК в формирование феномена резистентности, что касается как РМЖ, так и РПЖ [65–68]. Не приходится сомневаться в дальнейшем развитии этого направления исследований, в том числе и в отношении совершенствования имеющихся способов лекарственного воздействия.

Заключение

История гормонотерапии онкологических заболеваний — это десятилетия проб и ошибок, постепенно приводивших к немалым достижениям и более точным клиническим рекомендациям. Например, в лечении РМЖ последовательно применялись хирургическая и лучевая кастрация, андрогены, антиэстрогены, ингибиторы ароматазы и т.д. Важным этапом стало понимание роли ER, оценка вариантов рецепторного статуса РМЖ и определение связи между конкретным рецепторным фенотипом и оптимальной тактикой гормонотерапии. Со временем методы гормонотерапии становились менее агрессивны, более избирательны и в итоге более эффективны. Активное исследование роли микроРНК при РМЖ и РПЖ ведется лишь в течение нескольких лет. Накопленные описательные и экспериментальные данные довольно обширны, но пока фрагментарны и не формируют ясной карти-

ны взаимодействия микроРНК, ПГ и рецепторов последних. Попытка анализа доступных в настоящее время сведений, предпринятая в этом обзоре, дает основание предположить, что методы диагностики, прогнозирования и лечения опухолей гормонозависимых тканей (включая преодоление резистентности к гормонотерапии) на основе микроРНК войдут в клиническую практику в обозримом будущем. В отличие от этапа внедрения самых первых методов гормонотерапии, существующая методология анализа, профайлинга, синтеза соответствующих ингибиторов и аналогов (анти-микроРНК и микроРНК-миметиков) создает предпосылки для более быстрого, чем ранее, прогресса.

Целью этого краткого заключительного раздела обзора является попытка представить основные направления развития и перспективы применения диагностических и лечебных методов на основе микроРНК в столь важной в медицинском и социальном плане области, каковой представляется проблема РМЖ и РПЖ. В частности, наряду с расширением терапевтического потенциала на основе синтетических микроРНК (анти-микроРНК, микроРНК-миметики) [69], микроРНК-подходы дают возможность оптимизировать и методы гормоно- и химиотерапии [70, 71]. Немалое значение исследование микроРНК может приобрести в отношении оценки прогноза новообразований гормонозависимых тканей [72]. Наконец, важным элементом прикладного рассмотрения данной проблемы представляется оценка профиля экспрессии микроРНК с диагностической целью в биопсийном материале, а также в циркуляции (крови или моче), т.е. в составе экзосом, у больных РПЖ и РМЖ [73, 74], что может оказаться полезным для раннего разграничения гормоночувствительных и гормонорезистентных случаев этих заболеваний. Нельзя исключить и перспективность уже частично апробированной модификации гормоночувствительности и гормонорезистентности опухолевой ткани под влиянием антидиабетического бигуанида метформина, что может реализоваться и путем вовлечения микроРНК и ассоциированных с ними молекул [75, 76].

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Берштейн Л. М. Гормональный канцерогенез. СПб.: Наука, 2000. 199 с. [Berstein L. M. Hormonal carcinogenesis. St. Petersburg: Science, 2000. 199 p. (In Russ.)].
2. Risbridger G. P., Davis I. D., Birrell S. N. et al. Breast and prostate cancer: more similar than different. Nat Rev Cancer 2010;10(3):205–12.
3. Roop R. P., Ma C. X. Endocrine resistance in breast cancer: molecular pathways and rational development of targeted therapies. Future Oncol 2012;8(3):273–92.
4. Красильников М. А., Щербakov А. М. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска. Успехи молекулярной онкологии 2014;1(1):18–26. [Krasil'nikov M. A., Shcherbakov A. M. Estrogen-dependent signaling pathways and their role in the tumor progression: progress and perspectives. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;1(1):18–26. (In Russ.)].
5. Fletcher C. E., Dart D. A., Bevan C. L. Interplay between steroid signalling and microRNAs: implications for hormone-dependent cancers. Endocr Relat Cancer 2014;21(5):R409–29.
6. Cochrane D. R., Cittelly D. M., Richer J. K. Steroid receptors and microRNAs: relationships revealed. Steroids 2011;76(1–2):1–10.

7. Ottaviani S., de Giorgio A., Harding V. et al. Noncoding RNAs and the control of hormonal signaling via nuclear receptor regulation. *J Mol Endocrinol* 2014;53(2):R61–70.
8. Gregory R. I., Yan K. P., Amuthan G. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432(7014):235–40.
9. Finnegan E. F., Pasquinelli A. E. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2013;48(1):51–68.
10. Kawamata T., Tomari Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci* 2010;35(7):368–76.
11. Kawamata T., Seitz H., Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(9):953–60.
12. Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19(1):92–105.
13. Kavitha N., Vijayarathna S., Jothy S. L. et al. MicroRNAs: biogenesis, roles for carcinogenesis and as potential biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(18):7489–97.
14. Pulito C., Donzelli S., Muti P. et al. microRNAs and cancer metabolism reprogramming: the paradigm of metformin. *Ann Transl Med* 2014;2(6):58.
15. Ibrahim S. A., Hassan H., Gotte M. MicroRNA regulation of proteoglycan function in cancer. *FEBS J* 2014;281(22):5009–22.
16. Gadaleta R. M., Magnani L. Nuclear receptors and chromatin: an inducible couple. *J Mol Endocrinol* 2014;52(2):R137–49.
17. Castellano L., Giamas G., Jacob J. et al. The estrogen receptor- α -induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(37):15732–7.
18. Bhat-Nakshatri P., Wang G., Collins N. R. et al. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009;37(14):4850–61.
19. Pinho F. G., Frampton A. E., Nunes J. et al. Downregulation of microRNA-515-5p by the estrogen receptor modulates sphingosine kinase 1 and breast cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2013;73(19):5936–48.
20. Yamagata K., Fujiyama S., Ito S. et al. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell* 2009;36(2):340–7.
21. Nothnick W. B., Healy C., Hong X. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. *Endocrine* 2010;37(2):265–73.
22. Cochrane D. R., Cittelly D. M., Howe E. N. et al. MicroRNAs link estrogen receptor α status and Dicer levels in breast cancer. *Horm Cancer* 2010;1(6):306–19.
23. Cheng C., Fu X., Alves P. et al. mRNA expression profiles show differential regulatory effects of microRNAs between estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer. *Genome Biol* 2009;10(9):R90.
24. Adams B. D., Claffey K. P., White B. A. Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology* 2009;150(1):14–23.
25. Narayanan R., Jiang J., Gusev Y. et al. MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle. *PloS One* 2010;5(10):e13637.
26. Porkka K. P., Pfeiffer M. J., Waltering K. K. et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67(13):6130–5.
27. Ambs S., Prueitt R. L., Yi M. et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68(15):6162–70.
28. Ozen M., Creighton C. J., Ozdemir M. et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27(12):1788–93.
29. Waltering K. K., Porkka K. P., Jalava S. E. et al. Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *Prostate* 2011;71(6):604–14.
30. Ribas J., Ni X., Haffner M. et al. miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res* 2009;69(18):7165–9.
31. Shi X. B., Xue L., Yang J. et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(50):19983–8.
32. Xiao J., Gong A. Y., Eischeid A. N. et al. miR-141 modulates androgen receptor transcriptional activity in human prostate cancer cells through targeting the small heterodimer partner protein. *Prostate* 2012;72(14):1514–22.
33. Fletcher C. E., Dart D. A., Sita-Lumsden A. et al. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Hum Mol Genet* 2012;21(14):3112–27.
34. Mishra S., Deng J. J., Gowda P. S. et al. Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor β receptor II(TGFBR2) expression in prostate cancer. *Oncogene* 2014;33(31):4097–106.
35. Dart D. A., Brooke G. N., Sita-Lumsden A. et al. Reducing prohibitin increases histone acetylation, and promotes androgen independence in prostate tumours by increasing androgen receptor activation by adrenal androgens. *Oncogene* 2012;31(43):4588–98.
36. Brase J. C., Johannes M., Schlomm T. et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011;128(3):608–16.
37. Zhang H. L., Qin X. J., Cao D. L. et al. An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions. *Asian J Androl* 2013;15(2):231–5.
38. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95.
39. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654–9.
40. Mo W., Zhang J., Li X. et al. Identification of novel AR-targeted microRNAs mediating androgen signalling through critical pathways to regulate cell viability in prostate cancer. *PloS One* 2013;8(2):e56592.
41. Daniels G., Jha R., Shen Y. et al. Androgen receptor coactivators that inhibit prostate cancer growth. *Am J Clin Exper Urol* 2014;2(1):62–70.
42. Clark E. L., Coulson A., Dalglish C. et al. The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68(19):7938–46.
43. Leivonen S. K., Makela R., Ostling P. et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene* 2009;28(44):3926–36.
44. Ostling P., Leivonen S. K., Aakula A. et al. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2011;71(5):1956–67.
45. Mertens-Talcott S. U., Chintharlapalli S., Li X. et al. The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2007;67(22):11001–11.
46. Li X., Mertens-Talcott S. U., Zhang S. et al. MicroRNA-27a indirectly regulates estrogen receptor α expression and hormone responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2010;151(6):2462–73.
47. Zhao Y., Deng C., Wang J. et al. Let-7 family miRNAs regulate estrogen receptor α signaling in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127(1):69–80.
48. Pandey D. P., Picard D. miR-22 inhibits estrogen signaling by directly targeting the estrogen receptor α mRNA. *Mol Cell Biol* 2009;29(13):3783–90.
49. Spizzo R., Nicoloso M. S., Lupini L. et al. miR-145 participates with TP53 in a death-

- promoting regulatory loop and targets estrogen receptor- α in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2010;17(2):246–54.
50. Iorio M. V., Ferracin M., Liu C. G. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7065–70.
51. Kondo N., Toyama T., Sugiura H. et al. miR-206 expression is down-regulated in estrogen receptor α -positive human breast cancer. *Cancer Res* 2008;68(13):5004–8.
52. Zhao J. J., Lin J., Yang H. et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor α and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 2008;283(45):31079–86.
53. Di Leva G., Gasparini P., Piovan C. et al. MicroRNA cluster 221–222 and estrogen receptor α interactions in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(10):706–21.
54. Nadiminty N., Tummala R., Lou W. et al. MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2012;287(2):1527–37.
55. Kashat M., Azzouz L., Sarkar S. H. et al. Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness. *Am J Transl Res* 2012;4(4):432–42.
56. Gong A. Y., Eischeid A. N., Xiao J. et al. miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:492.
57. Shi X. B., Xue L., Ma A. H. et al. Tumor suppressive miR-124 targets androgen receptor and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene* 2013;32(35):4130–8.
58. Qu F., Cui X., Hong Y. et al. MicroRNA-185 suppresses proliferation, invasion, migration, and tumorigenicity of human prostate cancer cells through targeting androgen receptor. *Mol Cell Biochem* 2013;377(1–2):121–30.
59. Hagman Z., Hafliadottir B. S., Ceder J. A. et al. miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2013;108(8):1668–76.
60. Epis M. R., Giles K. M., Barker A. et al. miR-331-3p regulates ERBB-2 expression and androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem* 2009;284(37):24696–704.
61. Sikand K., Slaibi J. E., Singh R. et al. miR-488* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* 2011;129(4):810–9.
62. Lanz R. B., Razani B., Goldberg A. D. et al. Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(25):16081–6.
63. Hube F., Guo J., Chooniedass-Kothari S. et al. Alternative splicing of the first intron of the steroid receptor RNA activator (SRA) participates in the generation of coding and noncoding RNA isoforms in breast cancer cell lines. *DNA Cell Biol* 2006;25(7):418–28.
64. Redfern A. D., Colley S. M., Beveridge D. J. et al. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(16):6536–41.
65. Garcia-Becerra R., Santos N., Diaz L. et al. Mechanisms of resistance to endocrine therapy in breast cancer: focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. *Int J Mol Sci* 2012;14(1):108–45.
66. Ward A., Shukla K., Balwierz A. et al. MicroRNA-519a is a novel oncomir conferring tamoxifen resistance by targeting a network of tumour-suppressor genes in ER+ breast cancer. *J Pathol* 2014;233(4):368–79.
67. Li F., Mahato R. I. MicroRNAs and drug resistance in prostate cancers. *Molecular pharmaceutics* 2014;11(8):2539–52.
68. Ottman R., Nguyen C., Lorch R., Chakrabarti R. MicroRNA expressions associated with progression of prostate cancer cells to antiandrogen therapy resistance. *Mol Cancer* 2014;13:1.
69. Di Leva G., Piovan C., Gasparini P. et al. Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet* 2013;9(3):e1003311.
70. Zhao Y., Deng C., Lu W. et al. let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor α signaling in breast cancer. *Mol Med* 2011;17(11–12):1233–41.
71. Gan R., Yang Y., Yang X. et al. Downregulation of miR-221/222 enhances sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen through upregulation of TIMP3. *Cancer Gene Ther* 2014;21(7):290–6.
72. Tuomari M., Luostari K., Soini Y. et al. Overexpression of microRNA-200c predicts poor outcome in patients with PR-negative breast cancer. *PLoS One* 2014;9(10):e109508.
73. Dijkstra S., Birker I. L., Smit F. P. et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. *J Urol* 2014;191(4):1132–8.
74. Малек А. М., Берштейн Л. М., Филатов М. В. и др. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации. *Вопросы онкологии* 2014;60(4):429–36. [Malek A. M., Berstein L. M., Filatov M. V. et al. System of exosomal intercellular communications and its role in metastatic dissemination process. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2014;60(4):429–36. (In Russ.)].
75. Blandino G., Valerio M., Cioce M. et al. Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature Commun* 2012;3:865.
76. Avci C. B., Harman E., Dodurga Y. et al. Therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin: alteration of miRNA expression in prostate cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(2):765–8.

Роль транскрипционного фактора Ikaros в нормальном гемопоэзе и лейкозогенезе: биологические и клинические аспекты

О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»
Минздрава Республики Беларусь; Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Контакты: Ольга Сергеевна Вшивкова vshyukova@gmail.com

Изучение патогенеза, факторов прогрессии и развития рецидивов, причин лекарственной резистентности острых лейкозов (ОЛ) остается главной задачей онкогематологии и смежных областей. В патогенезе ОЛ достоверно известна роль более 50 генов и белков, в числе которых хорошо изученные опухолевые супрессоры (CDKN2A/CDKN2B, RB1, PTEN, p53) и классические химерные онкогены (BCR/ABL1, TEL/AML1, E2A/PBX, транслокации с участием MLL). Помимо этого установлена высокая частота aberrаций в генах, ответственных за лимфоидную дифференцировку, таких как транскрипционные факторы (PAX5, IKZF1 и EBF1), гены регуляции транскрипции (ETV6, ERG), сигнальных путей и антигенных рецепторов (BTLA, CD200, TOX, BLNK, VPREB1), а также гены, участвующие в развитии химиорезистентности лейкозов (NR3C1). Согласно результатам исследований последних 5 лет, частым молекулярным событием при лейкозах являются aberrации гена IKZF1 (Ikaros), белковый продукт которого относится к ДНК-связывающим белкам семейства Kruppel наряду с другими членами семейства IKZF2 (Helios), IKZF3 (Aiolos), Eos и Pegasus.

В гемопоэтических клетках Ikaros функционирует как транскрипционный фактор, является ключевым белком, контролирующим ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров и дендритных клеток. На ранних стадиях гемопоэза регуляторная роль Ikaros как транскрипционного фактора сводится к репрессии генов миелоидной и эритроидной линий дифференцировки и стимуляции генов, ответственных за лимфоидную дифференцировку.

Ikaros выступает в роли модулятора иммунного ответа и является опухолевым супрессором для лимфоидных опухолей. Данные многочисленных клинических исследований подтверждают связь между наличием aberrаций IKZF1 и развитием В-клеточных и, в меньшей степени, Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов. Вместе с тем в публикациях последних лет нарушения функций Ikaros связывают с развитием миелопролиферативных заболеваний и острого миелоидного лейкоза у детей. В контексте клинической значимости особая роль отводится внутригенным делециям IKZF1, а также коротким (нефункциональным) изоформам белка Ikaros, которые могут появляться в результате внутригенных делеций или aberrантного сплайсинга. Промонстрировано, что перечисленные нарушения гена IKZF1 и его белкового продукта играют ключевую роль в лимфоидной трансформации, опухолевой прогрессии и, возможно, в развитии химиорезистентности лейкозных клеток, что может отражаться в некорректной стратификации по группам риска, плохом результате лечения и низких показателях выживаемости.

В данном обзоре описаны частота и типы нарушений гена IKZF1 и его белкового продукта Ikaros, целесообразность включения этих маркеров в диагностические панели всех типов лейкозов и учета при определении минимальной остаточной болезни.

Несмотря на то, что Ikaros уже находит применение в клинической практике, с развитием интереса к этому молекулярному маркеру появляется ряд открытых вопросов. С точки зрения молекулярной биологии недостаточно исследованы механизмы регуляции экспрессии IKZF1 на этапах транскрипции и сплайсинга.

Предстоит определить клиническую роль точечных и субклональных делеций IKZF1, более точно выяснить прогностическое значение внутригенных делеций и aberrантного сплайсинга для разных групп пациентов с ОЛ и другими гемобластомами в связи с известными генетическими маркерами и схемой проводимой химиотерапии. Более детального изучения aberrации Ikaros требуют в качестве прогностического фактора развития костномозгового рецидива. Следует также решить вопрос о возможности учета статуса Ikaros при стратификации пациентов по группам риска, а также при определении уровня минимальной остаточной болезни.

Ключевые слова: Ikaros, IKZF1, альтернативный сплайсинг, гемобластоzy, делеции, изоформы, лейкозогенез, опухолевый супрессор, острый лимфобластный лейкоз, прогностический маркер, транскрипционный фактор

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.013–026

The role of Ikaros transcriptional factor in normal hematopoiesis and leukemogenesis: biological and clinical aspects

V. S. Vshivkova, A. N. Meleshko

Republican Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Ministry of Health of Belarus;
43 Frunzenskaya St., v. Borovlyany, Minsk region, 223053, Belarus

Investigation of the pathogenesis and factors effecting recurrence, progression and drug resistance in acute leukemia (AL) remains a major challenge for hematology and other related areas. The role of more than 50 genes and proteins in the AL pathogenesis has been shown, including the well-studied tumor suppressor (CDKN2A/CDKN2B, RB1, PTEN, p53), and classical fusion genes (BCR/ABL1, TEL/AML1,

E2A/PBX, MLL translocations). In addition, high frequency of aberrations in genes responsible for lymphoid differentiation have been identified such as transcription factors (PAX5, IKZF1 and EBF1), transcriptional regulation of the genes (ETV6, ERG), and signaling pathways of antigen receptors (BTLA, CD200, TOX, BLNK, VPREB1), as well as genes involved in chemoresistance of leukemia cells (NR3C1). In recent studies, Ikaros abnormalities have been reported to be frequently associated with AL. Ikaros is a member of a Kruppel-like family of zinc finger transcription factors that also includes IKZF2 (Helios), IKZF3 (Aiolos), Eos and Pegasus, and encoded by the IKZF1 gene. In hematopoietic cells Ikaros functions as a transcription factor, a key protein controlling T-, B-, NK-, and dendritic cells early differentiation. At the early hematopoiesis stages, it represses the myeloid and erythroid lineages, and stimulates the lymphoid differentiation. Ikaros also normally modulates immune response and plays role of a tumor suppressor in lymphoid malignances.

Data from numerous clinical studies confirmed an association between the presence of IKZF1 aberrations and B-cell and, to a lesser extent, T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL) development.

Besides, loss of Ikaros function was associated with progression of myeloproliferative diseases to acute myeloid leukemia (AML) in children. From clinical point of view, particular intragenic IKZF1 deletions and a short (non-functional) protein Ikaros isoforms, which may occur as a result of intragenic deletions or aberrant splicing, are the most significant features.

These mutations of IKZF1 gene and Ikaros aberrant expression play a key role in the lymphoid transformation, tumor progression, and may cause development of leukemic cells chemoresistance. Therefore, IKZF1 aberrations should be taken into account as a valuable prognostic marker for risk groups stratification, poor outcome and low survival rare.

This review compiles currently available data regarding the frequency and variants of the IKZF1 (Ikaros) aberrations, and the use of them in diagnostics of all types of leukemia and minimal residual disease detection.

Although Ikaros has already applied in clinical studies, a growing number of questions still remain unanswered. Molecular biology of IKZF1 expression and splicing regulation is not well understood. Clinical value of point mutations and subclonal deletion in IKZF1 locus should be elucidated. Prognostic significance of intragenic deletions and aberrant splicing is necessary to clarify for different groups of ALL patients, in connection with other genetic markers and therapy protocol. More detailed clinical analysis required for proving IKZF1 impact on probability of relapse, improving patients' risk stratification and application of minimal residual disease.

Key words: Ikaros, IKZF1, alternative splicing, hemoblastoses, deletions, isoforms, leukemogenesis, tumor suppressor, acute lymphoblastic leukemia, prognostic marker, transcription factor

Ген *IKZF1*. Структура и функции доменов «цинковых пальцев»

Ген *IKZF1* (*IKAROS family zinc finger 1; Ikaros; Lyf-1*) общей протяженностью 120 тыс. пар оснований расположен на хромосоме 7p12.2, состоит из 8 экзонов, 7 из которых являются белок-кодирующими. Длина полноразмерного транскрипта *IKZF1* насчитывает 6189 пар оснований, протяженность открытой рамки считывания (последовательность нуклеотидов, кодирующая белок) полноразмерной изоформы составляет 1560 пар оснований, при этом длина белкового продукта Ikaros – 519 аминокислотных остатков [1].

Ikaros – представитель отдельного семейства белков транскрипционных факторов (ТФ), отличительной особенностью которых является наличие ДНК-связывающих доменов, так называемых цинковых пальцев (Zn-fingers, ZnFs). «Цинковый палец» – это структурный домен, образованный полипептидной петлей, стабилизированной ионом цинка, который связан координационными связями с аминокислотными остатками двух молекул – цистеина и гистидина, что определяет отнесение этого домена к классу C2H2 [2].

Полноразмерная изоформа белка Ikaros содержит два отдельных кластера с «цинковыми пальцами»: 4 ZnFs на N-конце белковой молекулы (F1–4), необходимые для связывания с ДНК, а также 2 ZnFs на C-конце (F5, F6), обеспечивающие димеризацию Ikaros и его взаимодействие с другими белками (рис. 1). Отдельно можно выделить регион активации/репрессии, расположенный между кластерами «цинковых пальцев». В регионе активации локализована большая часть сайтов фосфорилирования для эпигенетическо-

го контроля работы белка – его «включения» или «выключения» на различных этапах клеточного цикла [2].

Функциональная активность Ikaros напрямую зависит от его способности связываться с ДНК при помощи четырех N-концевых «цинковых пальцев». Для стабильного связывания с ДНК белки семейства «цинковых пальцев» должны обладать как минимум 2 tandemными ZnFs. Потеря 2 и более «цинковых пальцев» в результате альтернативного сплайсинга, внутригенных или хромосомных делеций приводит к появлению коротких изоформ белка с низкой аффинностью или полной инертностью к ДНК. Такие короткие изоформы оказывают доминантно-негативный (DN) эффект, нарушая способность длинных изоформ Ikaros и других членов белкового семейства, таких как Aiolos и Helios, к связыванию с ДНК (рис. 2а). В экспериментах *in vivo* подтвержден факт наличия разных генных мишеней для каждого из ZnFs Ikaros [2, 3]. Благодаря наличию «цинковых пальцев» на C-конце белковые молекулы Ikaros способны формировать гомо- или гетеродимеры. Гомодимеризация происходит за счет взаимодействия аналогичных изоформ белка (рис. 2а). Партнерами для гетеродимеризации могут служить как различные изоформы Ikaros, так и другие члены этого семейства (Helios, Aiolos и др.), несущие белок-связывающие «цинковые пальцы» (рис. 2б, в). Существует предположение, что гетеродимеры, состоящие из разных изоформ белка, обладают различными функциями [3]. Тем не менее основная задача димеризации – контроль работы белкового комплекса при регуляции транскрипции и организации структуры хроматина.

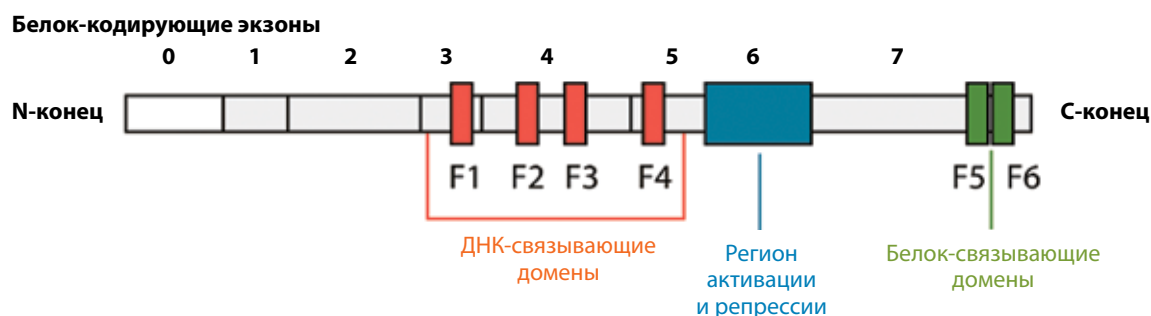


Рис. 1. Доменная структура полноразмерного белкового продукта *IKZF1*. ДНК-связывающие цинковые пальцы F1–4 отмечены красным, белок-связывающие мотивы F5, F6 — зеленым

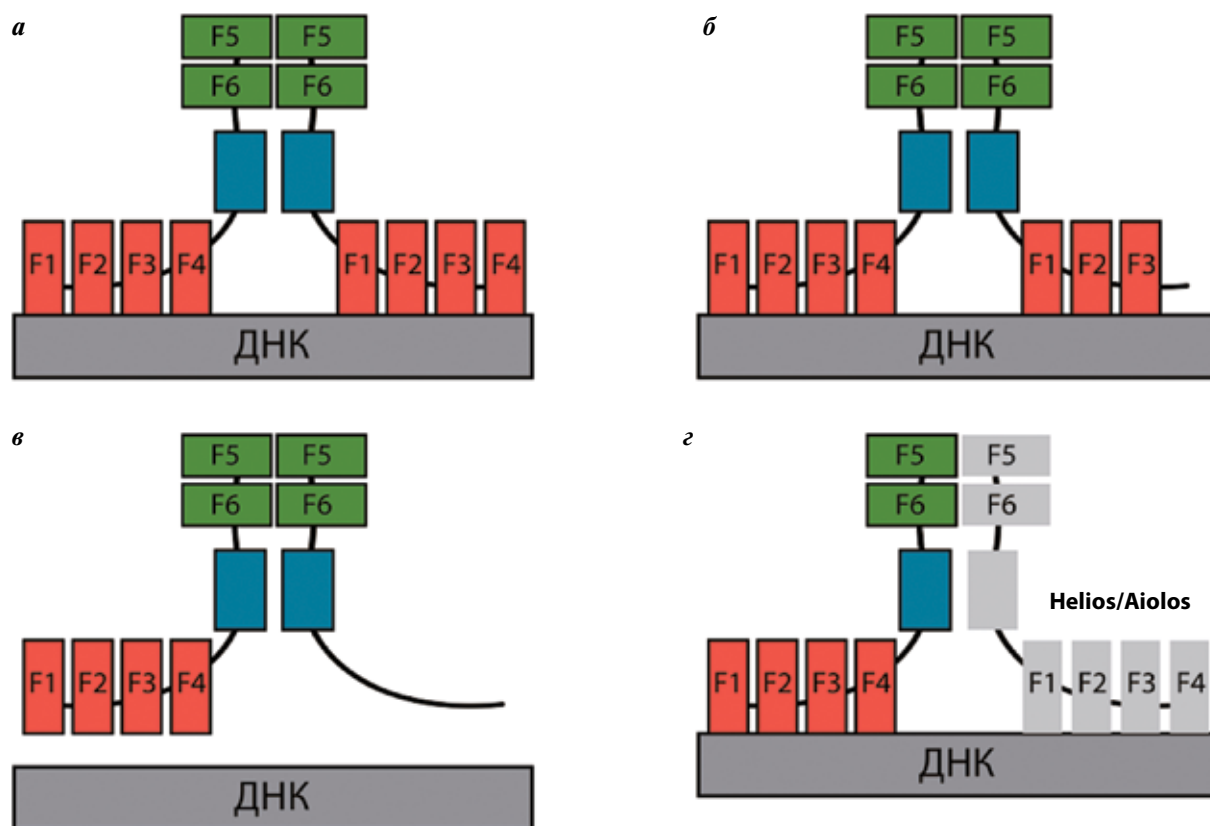


Рис. 2. Способы димеризации *Ikaros*: а — образование гомодимера между двумя молекулами *Ik1*; б — гетеродимеризация двух длинных изоформ белка; в — гетеродимеризация *Ik1* и короткой изоформы (DN) *Ikaros* — комплекс не способен к связыванию ДНК и выполнению своих функций по причине отсутствия ДНК-связывающих доменов; г — образование гетеродимера между *Ik1* и другим белком этого семейства (*Helios*, *Aiolos* и др.). Адаптировано из [3]

Альтернативный сплайсинг

Семь белок-кодирующих экзонов *IKZF1* транскрибируются по меньшей мере в 13 различных транскриптов посредством **альтернативного сплайсинга** (рис. 3). В результате образуются изоформы белка, отличающиеся между собой размерами и функциональной активностью.

Известные в настоящее время изоформы имеют идентичные белок-связывающие С-концевые домены, но различаются составом ДНК-связывающих ZnFs на N-конце. Изоформы белка *Ikaros*, в которых отсутствует 2 и более ДНК-связывающих «цинковых пальца», называются короткими: они не способны к взаи-

модействию с ДНК и, соответственно, выполнению своей основной функции [4]. Полноценно функционирующие, т.е. длинные изоформы *Ikaros* (1, 2, 2a, 3, 3a), содержат 3 или все 4 ZnFs в ДНК-связывающем домене. Длинные изоформы характеризуются внутриядерной локализацией в клетке и обладают высокой аффинностью к определенному промотору ДНК, функционируют как ТФ и участвуют в организации структуры хроматина. Мутационный анализ показал, что наличие функциональных ZnF2 и ZnF3 критично для высокоаффинного связывания мотива TGGAAT в регуляторных участках контролируемых генов. Два соседних домена ZnF1 и ZnF4 моделируют это связыва-

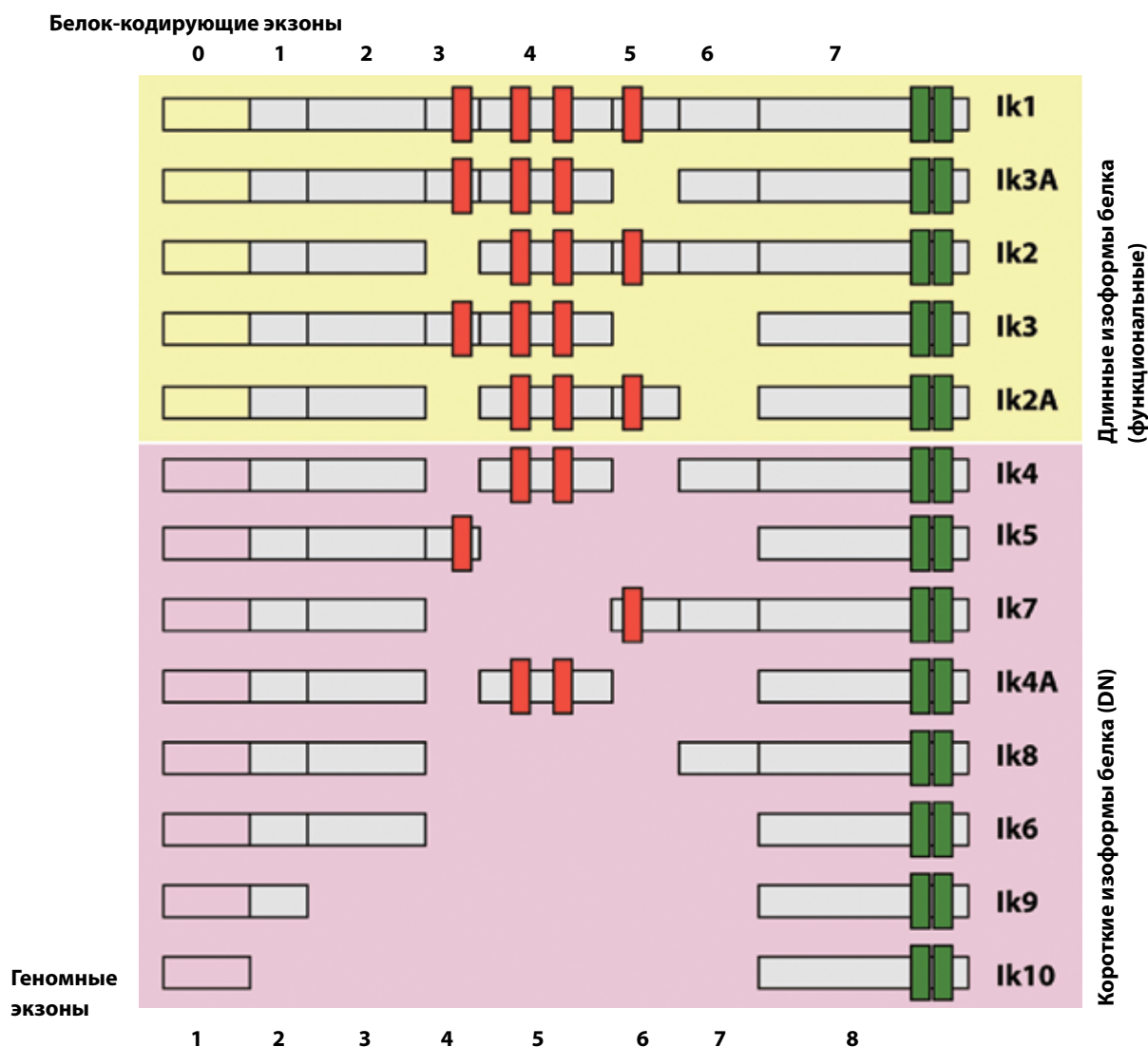


Рис. 3. Продукты альтернативного сплайсинга Ikaros (изоформы), описанные в настоящее время. Адаптировано из [12]. Кодированные экзоны схематично представлены в виде светло-серых прямоугольников, красные и зеленые прямоугольники символизируют домены типа «цинковых пальцев». ДНК-связывающие «цинковые пальцы» кодируются 3–5-м экзонами (красные), 7-й экзон кодирует два дополнительных «цинковых пальца» для белковых взаимодействий (зеленые). Длинные (1, 2, 2a, 3, 3a) и короткие изоформы Ikaros (4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9) выделены блоками

вание. N-концевые домены (ZnF5, ZnF6) определяют ядерную локализацию Ikaros [3, 4].

Короткие изоформы Ikaros (4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9) обладают DN-эффектом: они не только не способны к связыванию с ДНК, но и препятствуют функционированию длинных изоформ, а также других белков семейства Ikaros (см. рис. 2в); локализованы в цитоплазме. Наиболее распространенным вариантом коротких изоформ белка является Ik6 (80 % от всех DN-форм Ikaros). Транскрипционный вариант Ik10 описан как нетранслируемый транскрипт матричной РНК. В нем отсутствует большая часть кодирующего региона, включая 2-й геномный экзон, в котором находится старт-кодон [2, 5].

Разнообразие изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга, усложняется дополнительными вариациями на уровне «редактирования» РНК. Так, в нормальных гемопоэтических клетках

человека, а также линиях лейкозных клеток К. J. Payne et al. (2001) обнаружили инсерцию 60 пар оснований между 1-м и 2-м экзонами, характерную для транскрипционных вариантов Ik1, Ik2, Ik4, Ik7, Ik8, а также делецию 30 пар оснований для транскрипционных вариантов Ik1, Ik2. Авторы сообщают о необходимости дальнейших исследований для установления значения этих вариаций [5]. Был идентифицирован новый сплайс-вариант — Ik3a (другие используемые обозначения IkH, Ikx, Ik1+), идентичный Ik3, за исключением транскрибируемого экзона 6. Кроме того, в Ik3a обнаружена инсерция 60 пар оснований между экзонами 2 и 3, которая предположительно является добавочным экзоном. Таким образом, Ik3a является самой длинной из известных изоформ Ikaros у человека, за исключением полноразмерного транскрипта Ik1. Результаты иммуноблот-анализа продемонстрировали, что преобладающим в нормальных гемопоэтических

клетках является Ik3a, в то время как для опухолевого клона более характерна экспрессия Ik1, что может свидетельствовать о значительной роли Ik3a в контроле нормального гемопоэза у человека [5]. Однако, согласно нашим результатам, как в нормальных гемопоэтических, так и в лейкозных клетках наиболее высокий уровень экспрессии имеют изоформы Ik2 и Ik3/3a, каждая из которых превосходит Ik1 по уровню экспрессии в 1,5–2 раза [6].

L. Lhanjun et al. (2011) провели оценку функциональных различий двух наиболее длинных изоформ у человека – Ik1 и Ik3a. Исследование впервые позволило предположить, что Ik1 и Ik3a, а возможно и другие изоформы, могут иметь свои уникальные или даже противоположные функции в клетке, локализуясь при этом в различных субклеточных регионах [3].

Функционирование Ikaros как транскрипционного фактора

Основная функция белков семейства Ikaros – дифференцировка лимфоцитов, их созревание и модуляция иммунного ответа. Функционируя как ТФ, белок Ikaros связывается с определенными последовательностями в регуляторных районах генов и осуществляет избирательный контроль экспрессии генов-мишеней. Кроме того, Ikaros задействован в организации структуры хроматина, поскольку способен переводить ДНК в конденсированное состояние (гетерохроматин) и удерживать ее в такой форме. При этом Ikaros работает в составе белковых комплексов, контролирующих химические модификации гистонов и, следовательно, плотность упаковки ДНК в хроматине, ее доступность для транскрипции регулируемых генов.

Описано участие Ikaros в трех комплексах такого типа. В составе комплекса NuRD (nucleosome remodeling and deacetylating) белок Ikaros связывает ключевой компонент комплекса, белок Mi-2 β , и рекрутирует его к промоторам генов-мишеней. Гистон-деацетилаза (HDAC) в составе комплекса NuRD деацетилирует гистоны и сохраняет хроматин в конденсированном состоянии, что подавляет экспрессию генов-мишеней на протяжении нескольких клеточных делений [7, 8].

Часть белка Ikaros входит в состав комплекса Sin3. В этом случае Ikaros связывается с транскрипционно-активными генами, ассоциирует с ко-репрессором Sin3, что приводит к рекрутированию HDAC, конденсированию хроматина и снижению экспрессии генов [7, 8].

Наконец, Ikaros может выступать в качестве активатора экспрессии генов, рекрутируя комплекс Swi/Snf к генам-мишеням. Этот комплекс способствует «открытию» структуры хроматина за счет привлечения гистон-ацетилаз (HAC) или другого аденозинтрифосфат-зависимого механизма, что способствует активации транскрипции генов [7, 8]. Ikaros также способен кооперироваться с другими активаторами транскрипции, такими как Sp1 и USF1 [9, 10].

В целом на ранних стадиях гемопоэза регуляторная роль Ikaros как ТФ сводится к репрессии генов миелоидной и эритроидной линий дифференцировки и стимуляции генов, ответственных за лимфоидную дифференцировку.

Регуляция функциональной активности Ikaros

Существуют немногочисленные данные о механизмах, регулирующих экспрессию гена *IKZF1* на этапе транскрипции, однако механизмы посттранскрипционной регуляции его активности и/или уровня экспрессии белка изучены в большей степени. Функциональная активность Ikaros может определяться по крайней мере четырьмя механизмами: 1) альтернативный сплайсинг длинных изоформ, приводящий к изменению сродства Ikaros к ДНК или специфичности этого связывания; 2) альтернативный сплайсинг, приводящий к появлению DN-изоформ Ikaros, ингибирующих ДНК-связывающую активность других изоформ и белков семейства; 3) фосфорилирование белка Ikaros, приводящее к снижению сродства к ДНК и изменению его локализации в ядре (например, сайт-специфическое фосфорилирование казеинкиназой-2); 4) вызванные фосфорилированием изменения в стабильности белка Ikaros, обеспечивающие его восприимчивость к убиквитин-опосредованной деградации [11].

Таким образом, существование многочисленных механизмов контроля функциональной активности Ikaros позволяет предположить, что полная картина регуляции более сложна и подчеркивает важность исследований Ikaros на уровне белка [11, 12].

Изучение функций Ikaros на мышинных knockout-моделях

Первоначально *IKZF1* был описан как лимфоид-специфичный ТФ, отвечающий за регуляцию Т-клеточной дифференцировки. Было показано, что белок Ikaros выступает как энхансер, связывающийся с регуляторными последовательностями и усиливающий экспрессию ранних маркеров дифференцировки Т-клеток [13, 14]. Позже на нокаутных линиях мышей была более детально установлена функция этого гена в гемопоэзе и формировании иммунной системы.

В первом *in vivo* исследовании функций Ikaros K. Georgopoulos et al. (1994) получены knockout-мыши с гомозиготными и гетерозиготными делециями ДНК-связывающих доменов *IKZF1* (делеция 3-го и 4-го экзонов) [15]. Мутация не оказалась летальной *in utero*. Мыши с гомозиготной делецией (фенотип Ikaros^{DN/DN}, рис. 4a) отставали в росте и погибали от множественных инфекций до 4 недель. Животные имели рудиментарный тимус, лимфатические узлы отсутствовали, селезенка была увеличена и заполнена клетками эритроидного и миелоидного происхождения. Наблюдалось полное отсутствие зрелых Т- и В-лимфоцитов, $\gamma\delta$ -Т-клеток, эпидермальных дендритных клеток (ДК) (табл. 1).

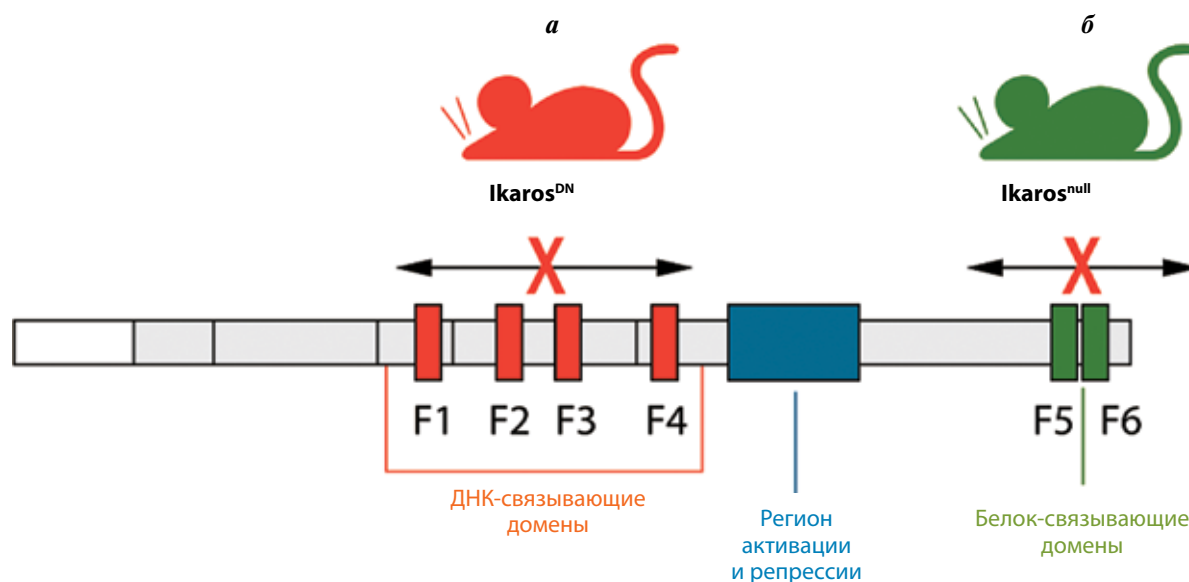


Рис. 4. Характеристика нокаутных мышей, использованных *in vivo* исследованиях функций Ikaros: у Ikaros^{DN}-мышей отсутствуют ДНК-связывающие домены; у Ikaros^{null}-мышей из-за отсутствия белок-связывающих доменов Ikaros не способен к взаимодействию с другими белками и функционально неактивен. Адаптировано из [16]

Таблица 1. Основные фенотипические проявления дисфункции Ikaros, установленные в экспериментах на knockout-моделях мышей

Мутация	Экспрессия белка	Фенотип
Ikaros ^{null/null}	Полная дисфункция белка. Null-фенотип	Снижение клоногенной активности стволовой клетки крови в 30–40 раз. Снижение количества В-, Т-клеток, натуральных киллеров (natural killers, NK), ДК. Клональная Т-клеточная экспансия. Смещение баланса CD4/CD8 Т-лимфоцитов в сторону CD4-клеток. Относительное снижение миелоидных клеток
Ikaros ^{DN/DN}	Все экспрессирующиеся изоформы белка являются DN-изоформами	Снижение клоногенной активности стволовой клетки крови более чем в 100 раз. Полное отсутствие всех лимфоцитов, NK, ДК
Ikaros ^{null/wt}	Null-мутация в гетерозиготе. Экспрессируется одна аллель гена	Нормальное количество и фенотип лимфоцитов. Увеличенная TCR-опосредованная лимфопролиферация. Повышенная частота Т-клеточных лейкозов и лимфом
Ikaros ^{DN/wt}	DN-мутация в гетерозиготе. Экспрессия как длинных, так и коротких (DN) изоформ белка	Нормальное количество и фенотип лимфоцитов. Увеличенная TCR-опосредованная лимфопролиферация. Развитие Т-клеточных лейкозов и лимфом с частотой 100 %
Aiolos ^{null/null}	Полное отсутствие белка. Null-фенотип	Повышение пре-В и В-лимфоцитов в костном мозге. Снижение рециркулирующих, перитонеальных и других периферических В-лимфоцитов. Продукция аутоантител. Увеличенная BCR-опосредованная лимфопролиферация. Переключение изотипа иммуноглобулина (Ig) без иммунизации. Развитие В-клеточных опухолей
Aiolos ^{null/null} Ikaros ^{null/wt}		Усиленный эффект мутации Aiolos ^{null/null} в периферии. Повышенная частота Т- и В-клеточных опухолей

Примечание. TCR — Т-клеточный рецептор (T-cell receptor).

В последующей работе авторов [16] на knockout-мышцах с гомозиготными и гетерозиготными делециями ДНК-связывающих доменов *IKZF1* установлено его влияние на процессы Т-клеточной пролиферации. Мыши с гетерозиготной делецией демонстрировали значительную TCR-опосредованную лимфопролиферацию Т-клеток в отсутствие антигенной стимуляции. По истечении 3 мес у 100 % мышей развились лимфаденопатии, характеризовавшиеся увеличением лим-

фоузлов в 20–50 раз, развитием Т-клеточных лейкозов или лимфом. Аберрантная популяция лимфоцитов имела клональную природу и происходила из тимуса. При этом в опухолевых клетках наблюдалась потеря гетерозиготности, т. е. инактивация нормальной аллели гена *IKZF1*.

J. H. Wang et al. [17] получили knockout-мышей с делецией 7-го экзона, кодирующего белок-связывающие домены на С-конце Ikaros. Эта мутация в гомо-

зиготном состоянии выражается в *Ikaros*^{null}-фенотипе (рис. 4б).

Такой белок не способен к димеризации, взаимодействию с другими белками и функционально не активен. Однако нарушения в лимфоидной системе у *null*-мышей оказались менее фатальными, чем у животных с *DN*-фенотипом: полностью отсутствовали зрелые В-лимфоциты; тимоциты накапливались в тимусе в количестве в 100–300 раз меньше, чем у равновозрастных мышей дикого типа. Дальнейшая дифференцировка Т-клеток также была нарушена в сторону значительного преобладания *CD4+CD8*– Т-клеток. Не обнаруживались $\gamma\delta$ -Т-клетки, NK и эпидермальные ДК. При этом эритроидная и миелоидная линии дифференцировки существенно не пострадали. Гетерозиготные мыши с генотипом *Ikaros*^{null/wt} также были склонны к образованию Т-клеточных опухолей, но в меньшей степени, чем *Ikaros*^{DN/wt}-мыши (см. табл. 1).

При сравнении фенотипических эффектов двух типов мутаций *Ikaros*^{null}, *Ikaros*^{DN} и их гетерозигот привлекают внимание более тяжелые нарушения лимфоидной дифференцировки *DN*-генотипа в сравнении с *null*-генотипом. Различия в фенотипе этих двух мутаций определяются комплементарным действием других членов семейства — *Helios* и *Aiolos*. Короткие изоформы у *Ikaros*^{DN}-мышей не способны к связыванию ДНК, однако сохраняют способность к гетеродимеризации с другими членами семейства, подавляя их активность по доминантно-негативному механизму.

Ikaros – ключевой фактор развития Т-клеток

Согласно современным представлениям, в норме развитие клеточных элементов костного мозга начинается от плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки (hematopoietic stem cell, HSC). Лимфомиелоидный росток подвергается сложной дифференцировке, на первом этапе которой HSC индуцируется в мультипотентную лимфоидную клетку-предшественника (lymphoid-primed multipotent progenitor, LMPP). Она дифференцируется до клетки-предшественника миелоцитов (granulocyte-macrophage progenitor, GMP) и ранней лимфоидной клетки-предшественника (early lymphoid progenitor, ELP) — клетки с широким потенциалом дифференцировки, включая миелоидный путь. Последняя мигрирует из костного мозга в тимус, где в результате ее праймирования каскад событий приводит к появлению ранних предшественников лимфоцитов (earliest thymic precursors, ETP) и общей лимфоидной клетки-предшественника (common lymphoid progenitor, CLP) [18, 19].

ETP являются наиболее ранними представителями Т-клеточного ряда и имеют фенотип *CD4*–*CD8*–, в связи с чем их называют дважды отрицательными (ДО, англ. double negative). ETP проходят несколько последовательных стадий развития (от ДО1 до ДО3), оставляя за собой фенотип *CD4*–*CD8*–, претерпевают при этом реаранжировку тяжелых цепей иммуногло-

булинов (*V(D)J*-рекомбинация), что приводит к формированию антиген-распознающих участков иммуноглобулинов (α -, β -, γ - и δ -цепей) и TCR. Созревают популяции *TCR* $\alpha\beta$ и *TCR* $\gamma\delta$ ($\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -Т-клетки) предшественников Т-клеток, параллельно с этими событиями происходит созревание пула NK-клеток и эпидермальных ДК (клеток Лангерганса). Клетки с функциональным TCR переходят на стадию ДО4 и подвергаются процессу позитивной селекции, превращаясь в дважды положительные (ДП, англ. double-positive) *CD4+CD8+*-клетки. ДП-timoциты активно делятся, теряют один из рецепторов *CD4* или *CD8* (негативная селекция), переходят в стадию моноположительных клеток (single-positive) и мигрируют из тимуса в периферические органы иммунной системы для осуществления своей функции [18, 20].

Экспрессия белка *Ikaros* появляется уже на раннем этапе дифференцировки (рис. 5), когда стволовая клетка крови дифференцируется до общих LMPP, которые, в свою очередь, дают начало миелоидным и общим лимфоидным предшественникам (GMP, ELP) [18]. Выбор дальнейшей дифференцировки между В- и Т-лимфоцитами зависит от ряда вне- и внутриклеточных сигналов. При обособлении Т-клеточного ряда такими триггерами служат белки *Gata-3* и *Notch-1*, экспрессия которых находится под контролем *Ikaros* [21, 22]. Дальнейшие этапы дифференцировки лимфоцитов контролируются совместно с другими линейно-специфическими ТФ.

Показано участие ТФ *Ikaros* в контроле этапов реаранжировки генов *TCR* [23]. В данном случае целевыми для *Ikaros* являются гены α -, β - и δ -цепи *TCR*, субъединицы *CD3*, *CD4*, *CD2*, интерлейкин-2 (*IL-2*), *IL-2R α* и др. [24]. При наличии мутаций *IKZF1* на поверхности клеток снижается плотность функционирующих TCR, в результате подавляющее большинство клеток не способно воспринимать достаточный для последующей дифференцировки уровень сигнала извне и вступать в фазу позитивной селекции [25]. K. W. Tinsley et al. отметили неспособность ДП-клеток к дифференцировке в зрелый Т-лимфоцит при экспрессии доминантно-негативных изоформ *Ikaros*. Вместо этого клетки приобретали смешанный профиль маркеров дифференцировки, характерный как для зрелых, так и для незрелых тимоцитов. Такой фенотип не приводил к развитию опухолей, поскольку атипичные клетки подвергались аресту и массовому апоптозу, однако влек за собой полное отсутствие зрелых форм лимфоцитов, ДК и NK [26].

Таким образом, *Ikaros* является ключевым фактором как минимум на трех различных стадиях Т-клеточной дифференцировки: 1) на стадии деления LMPP; 2) при обособлении лимфоидных предшественников (ELP, а затем и ETP) от общего ствола и 3) на ранних этапах Т-клеточной дифференцировки при реаранжировке TCR и переходе ДО3/ДО4-клеток в ДП *CD4+CD8+* пре-Т-клетки [17, 18, 27, 28].

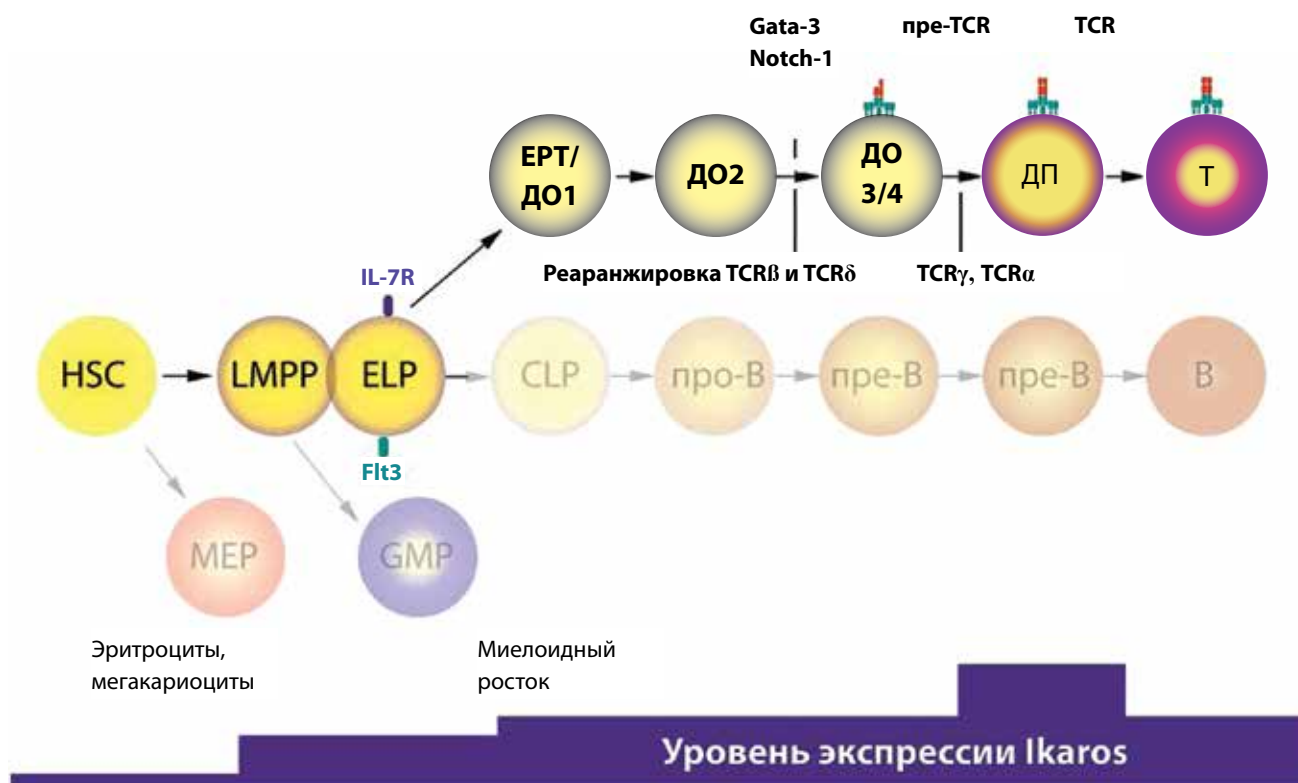


Рис. 5. Уровень экспрессии *Ikaros* отражает степень его участия на разных этапах созревания Т-клеток. Адаптировано из [13]

Контроль В-клеточной дифференцировки

Параллельно с созреванием Т-клеток в костном мозге несколько последовательных стадий развития проходят В-клетки, предшественником которых является CLP. Дифференцировка CLP в направлении про- и пре-В-клеток (от англ. progenitor — предок и precursor — предшественник) происходит в случае активации поверхностных рецепторов Flt3 и IL-7 (IL-7R). На этом этапе характерна экспрессия ТФ EBFI, что делает возможным дальнейшее прогрессирование к стадии про-В и индуцирует экспрессию генов, специфичных для В-клеток. В частности, ген *Rax5*, который является ключевым фактором обособления В-линии, ограничивает возможности развития лимфоидных прогениторов только путем развития В-клеток [19, 29, 30]. Начиная экспрессироваться в ELP, *Ikaros* стимулирует экспрессию генов *Flt3* и *IL-7R* [20, 31] на поверхности CLP (рис. 6).

В дальнейшем, на этапе про-В, клетки подвергаются V(D)J-рекомбинации, что приводит к экспрессии поверхностного В-клеточного рецептора (B-cell receptor, BCR) и обеспечивает клеткам способность воспринимать сигнал к созреванию до пре-В-клеток. Далее, после нескольких раундов деления и реаранжировки легких цепей Ig, клетки, экспрессирующие функциональные BCR, мигрируют в селезенку для заключительных стадий созревания [20]. На данном этапе специфика работы *Ikaros* заключается в регуляции реаранжировки генов Ig, в первую очередь путем активации экспрессии генов *Rag1/2*, осуществляющих

рекомбинацию [19, 32]. На этапе реаранжировки легких цепей Ig *Ikaros* принимает участие в контроле процесса аллельного исключения, т. е. обеспечивает специфичность антигенсвязывающего участка зрелой В-клетки. Дисфункция ТФ на данном этапе отражается в нарушениях сигнальных путей предшественников В-клеток и их неспособности к дальнейшей дифференцировке в зрелые лимфоциты [13]. Исследования последних лет демонстрируют вклад *Ikaros* в динамическое регулирование генов адгезии и миграции клеток: обеспечение репрессии этих генов на стадии про-В-клеток и более высокой экспрессии на стадиях CLP и пре-В-клеток [19].

После дифференцировки клеток из про-В в пре-В *Ikaros* подавляет экспрессию компонента пре-В-клеточного рецептора Lambda5 [19, 20].

В периферических отделах *Ikaros* регулирует порог активации В-клеток по отношению к антигену или Т-клеточной ко-стимуляции; ингибирует пролиферацию гиперактивированных В-клеток. Наконец, во время переключения изотипа антител *Ikaros* контролирует выбор изотипа путем ингибирования перехода на IgG2b и IgG2a и инициирует переход ко всем другим изотипам [13, 20].

Таким образом, исследования функций *Ikaros* у нокаутных мышей наряду с клиническими данными убедительно свидетельствуют о роли этого белка в качестве опухолевого супрессора, однако механизмы контроля опухолесупрессорной функции *Ikaros* до настоящего времени не определены [33]. Данные много-

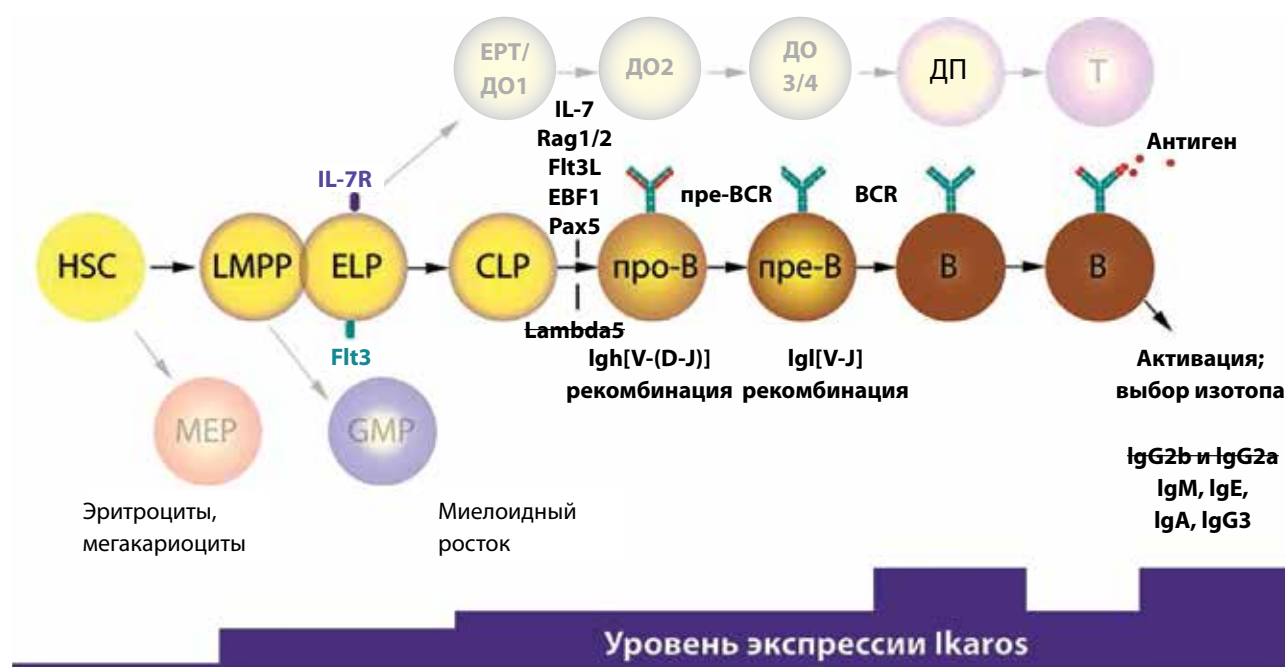


Рис. 6. *Ikaros* контролирует клеточную дифференцировку на нескольких этапах развития В-лимфоцитов. Адаптировано из [19]

численных клинических исследований подтверждают связь между наличием aberrаций *IKZF1* и развитием В-клеточных и, в меньшей степени, Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ). Вместе с тем в публикациях последних лет нарушения функций *Ikaros* связывают с развитием миелопролиферативных заболеваний [13, 34, 35] и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей [36].

Характеристика структурных нарушений *IKZF1*

При лейкозах обнаружены следующие варианты структурных мутаций гена *IKZF1*: геномные aberrации (моносомия 7-й хромосомы), хромосомные перестройки (крупные делеции и транслокации) и внутригенные мутации (небольшие делеции и точечные мутации). Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в сверхэкспрессии коротких изоформ (рис. 7).

В функциональном отношении все структурные aberrации являются loss-of-function, т. е. приводят к потере или нарушению функции белка. **Моносомия 7-й хромосомы**, делеция ее короткого плеча и в особенности **хромосомные перестройки** во всех случаях выражаются серьезными комплексными нарушениями

физиологических функций не только со стороны системы гемопоэза. Частота перечисленных aberrаций не превышает 5 % и всегда ассоциирована с полной потерей как минимум одного из аллелей *IKZF1*.

Наиболее распространенным (45 %) типом aberrаций *IKZF1* при острых лейкозах (ОЛ) являются **внутригенные делеции** 15–200 тыс. пар оснований, приводящие к потере нескольких экзонов (рис. 8).

Среди внутригенных делеций наиболее часто (не менее 30 %) обнаруживается делеция экзонов 3–6 ($\Delta Ex3-6$). Стабильность точек разрыва ДНК можно объяснить расположением в этих локусах последовательностей, между которыми происходит ошибочная RSS-рекомбинация при V(D)J-реаранжировке про-В-клеток из-за aberrантной активации генов *Rag1/2* (контроль над активностью которых, как сказано выше, осуществляет *Ikaros*) [37]. Вторая распространенная делеция (15 %) также происходит в результате aberrантной RSS-рекомбинации и захватывает экзоны 1–6 ($\Delta Ex1-6$). Мутация, вероятнее всего, приводит к образованию нефункционального аллеля гена, поскольку 1-й экзон включает в себя стоп-кодон ATG. Частота встречаемости других известных делеций ($\Delta Ex1-7$ и $\Delta Ex3-7$) по разным данным не превышает 4 %.

К дисфункции белка *Ikaros* приводят:

Моносомия 7-й хромосомы,
делеция p7 или
хромосомные перестройки

Внутригенные
делеции (45 %)

Нарушения
сплайсинга

Рис. 7. Варианты нарушений, приводящие к дисфункции гена *IKZF1*

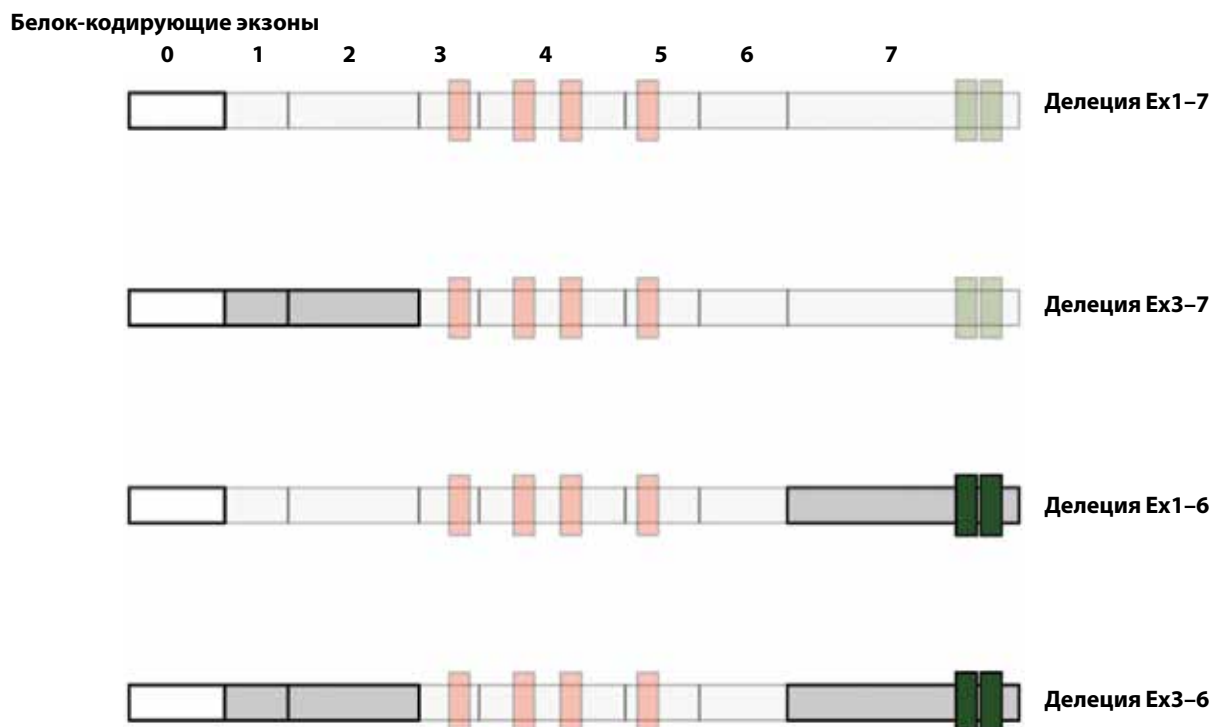


Рис. 8. Схемы образования внутригенных делеций *IKZF1*. Полупрозрачные элементы — участки гена, которые удаляются во время альтернативного сплайсинга при образовании разных изоформ белка

Логично предположить, что в результате делеций такого типа механизм сплайсинга будет нарушен, и это, вероятно, приведет к образованию нефункциональных, т.е. DN-изоформ белка. Так, наиболее часто встречающаяся DN-изоформа Ikaros образуется в результате делеции Ex3–6 и последующего сплайсинга между экзонами 2 и 7. Однако до настоящего времени вопрос взаимосвязи этих двух молекулярных событий остается спорным — в литературе высказаны две гипотезы появления коротких изоформ Ikaros. Согласно первой (F. Klein et al., 2006), такой альтернативный сплайсинг является результатом эпигенетического воздействия, в том числе вызванного биохимическими эффектами химерного онкогена *BCR/ABL*. Другой точки зрения придерживаются проф. C.G. Mullighan et al., указывая, что наличие делеций в гене является единственной причиной aberrантного сплайсинга [38, 39]. Сопоставив частоту внутригенных делеций в гене *IKZF1* и уровень экспрессии коротких изоформ гена *Ikaros* у пациентов с ОЛЛ и здоровых доноров, мы поддерживаем теорию C. Mullighan и продолжаем дальнейшие исследования в этой области [6].

У здоровых доноров может регистрироваться невысокий уровень экспрессии коротких изоформ Ikaros [40]. Предполагается, что их появление отражает естественный механизм отрицательной регуляции функции *IKZF1* как ТФ [10].

Таким образом, полная потеря функции гена может быть вызвана делецией сразу двух аллелей *IKZF1* (12 % всех *IKZF1*-мутаций), а также мутациями, приводящими к образованию DN-форм Ikaros (33 % всех

IKZF1-мутаций). Частичная потеря функции *IKZF1* может быть связана с инактивацией одной аллели [5, 36, 39]. Аберрации, связанные с потерей функции Ikaros, — биаллельные делеции и DN-формы — особенно характерны для Ph⁺ ОЛЛ. Другие мутации приводят к менее выраженному угнетению функции Ikaros, т.е. гаплодефициту, что наблюдается в 55–70 % всех мутаций *IKZF1* при Ph[–] ОЛЛ [39].

Открытым остается также вопрос наличия субклональных делеций *IKZF1*. Нередко у пациентов с ОЛ помимо основного лейкоэмического клона регистрируется один или более субклонов, характеризующихся собственной кинетикой и молекулярными событиями. Исследование близнецов и отслеживание субклональных нарушений в различных генах позволяет предположить, что транслокация *BCR/ABL1* является первым событием онкогенеза, в то время как мутации *IKZF1* происходят позже, уже на стадии развития лейкоза. Сообщается о случаях «конвергентной» эволюции мутаций *IKZF1*, при этом у одного и того же пациента могут обнаруживаться несколько субклонов, несущих различные мутации *IKZF1*, однако до сих пор эти данные не нашли практического применения [41].

Исследования частоты делеций *IKZF1* (табл. 2) могут быть условно разделены на те, которые были проведены до 2008 г., и более поздние, опубликованные в период активного развития геномных технологий (что отражается в росте частоты обнаруживаемых мутаций). В настоящее время структурные изменения *IKZF1* регистрируются в более чем 20 % случаев детских ОЛЛ (из них около 90 % — внутригенные делеции

Таблица 2. Частота встречаемости внутригенных делеций *IKZF1* при лейкозах

Авторы, год [источник]	Диагноз, число пациентов в исследовании	Частота делеций, %				
		$\Delta Ex1-7$	$\Delta Ex3-7$	$\Delta Ex1-6$	$\Delta Ex3-6$	все
Mullighan C. G. et al., 2007 [43]	В-ОЛЛ (BCR/ABL1+/- ОЛЛ), $n = 242$					9
Mullighan C. G. et al., 2008 [39]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 43$					83,7
	Хронический миелоидный лейкоз, $n = 23$					1,12
Kawamata N. et al., 2008 [44]	В-ОЛЛ (BCR/ABL1+/- ОЛЛ), $n = 399$					< 2
Paulsson K. et al., 2008 [45]	ОЛЛ, $n = 45$					18
Martinelli G. et al., 2009 [46]	BCR/ABL1+ ОЛЛ, $n = 83$			20	37	63
Mullighan C. G. et al., 2009 [47]	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 221$					28,6
Den Boer M. L. et al., 2009 [48]	BCR/ABL1+ ОЛЛ					73
	BCR/ABL1- ОЛЛ, $n = 297$ в 2 группах					39
Okamoto R. et al., 2010 [49]	В-ОЛЛ					15
	Т-ОЛЛ; в 2 группах $n = 75$ (взрослые) + 399 (дети)					0
Iacobucci I. et al., 2012 [50]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 106$			26	49	75
	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 38$					58
Cayre A. et al., 2012 [51]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 60$	2	4	7	24	75*
	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 512$	1	4	8	34	13,5*
Tocunaqa K. et al., 2013 [52]	BCR/ABL1+ В-ОЛЛ, $n = 24$					83,3
	BCR/ABL1- В-ОЛЛ, $n = 54$					38,9
de Rooij J. et al., 2014 [53]	ОМЛ, $n = 258$					4,3

Примечание. * — с учетом субклональных делеций.

и 10 % — точечные мутации; 70 % случаев приходится на *BCR/ABL1*-позитивный ОЛЛ); в 30–50 % случаев взрослых ОЛЛ, в том числе при *de novo* ОЛЛ, а также при ОМЛ и гораздо реже — при хроническом миелоидном лейкозе на стадии прогрессирования болезни в бластный криз [42].

Точечные мутации, как правило, представляют собой мутации сдвига рамки считывания, ведущие к появлению стоп-кодонов. Их клиническое значение еще предстоит установить. Известны точечные мутации в локусах ДНК-связывающих доменов «цинковых пальцев», приводящие к дисфункции Ikaros при Т-ОЛЛ у мышей [54]. В более ранних исследованиях больших когорт пациентов с В-ОЛЛ точечные мутации выявлены не были. Эти расхождения могут отражать технические недостатки методов исследования или же невысокую частоту точечных мутаций *IKZF1* при *BCR/ABL1*+ ОЛЛ [39, 54, 55]. Тем не менее частота точечных мутаций *IKZF1* при ОЛЛ по результатам полногеномного секвенирования, обеспечившего получение более точных данных, составляет 10 % [56]. Появились данные о повышенной частоте некоторых точечных замен (например, полиморфизм rs4132601) при В-ОЛЛ [57].

Прогностическое значение мутаций *IKZF1*

Значение aberrаций гена *IKZF1* при ОЛЛ было установлено относительно недавно — в исследованиях, начатых проф. С. G. Mullighan в St. Jude Children's Research Hospital (США). В первом исследовании делеции *IKZF1* были охарактеризованы как наиболее часто встречающиеся генетические aberrации в *BCR/ABL1*+ лейкозах и, таким образом, установлена ассоциация между этими двумя структурными нарушениями ДНК. Были проанализированы *BCR/ABL1*+ В-линейные ОЛ у детей и взрослых методом SNP-arrays. Из 43 таких случаев в 36 (83,7 %) были выявлены делеции в *IKZF1* (16 из 21 ребенка и 20 из 22 взрослых) [42].

В следующем исследовании тех же авторов геномный анализ был выполнен на большой группе детей с В-линейным ОЛЛ методом SNP-arrays на ДНК, выделенной из лейкозных клеток костного мозга [47]. Была доказана достоверно повышенная частота рецидивов в общей когорте больных: 46,3 % пациентов с делецией в гене *IKZF1* против 22,5 % без нее ($n = 258$; $p = 0,002$). Еще большие различия выявлены в стандартизированной когорте пациентов (без *BCR/ABL1*, младенцев и гиподиплоидных ОЛЛ) — 55,2 % у па-

циентов с делецией в гене *IKZF1* против 14 % без нее ($n = 221$; $p < 0,001$). В этом же исследовании продемонстрирована ассоциация между наличием делеций в локусе *IKZF1* и уровнем минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й и 29-й день терапии. Из 67 пациентов с делециями в этом гене 16 (23,9 %) имели высокий уровень МОБ (> 1 %) на 29-й день в сравнении с 6,6 % пациентов без этой аберрации ($p = 0,001$).

Группа европейских исследователей по результатам геномного анализа высокого разрешения установила, что у пациентов с В-линейным ОЛЛ, развивших впоследствии рецидив (13 из 34; 38,2 %), частота делеций в гене *IKZF1* на 2-м месте по частоте встречаемости после аберраций гена ингибитора циклин-зависимых киназ *CDKN2A* (15 из 34; 44,1 %) [58]. Пациенты с делециями *IKZF1* имели значительно более низкую безрецидивную выживаемость (39 % с делециями против 89 % wt, $p < 0,001$) и сниженную общую выживаемость (56 % с делециями против 91 % wt, $p < 0,001$) в общей группе пациентов. Достоверные различия сохранялись как для группы высокого риска, так и для пациентов без высокого риска.

В исследованиях китайских авторов на большой группе больных ОЛЛ показана худшая безрецидивная выживаемость у пациентов со сверхэкспрессией короткой изоформы Iκ6 [59, 60]. Iκ6 оказался независимым неблагоприятным прогностическим фактором для показателей общей и безрецидивной выживаемости у детей, в том числе при *BCR/ABL1*-негативных детских В-линейных ОЛ, но не *BCR/ABL1*-негативных взрослых лейкозов.

Необходимость учета делеций гена *IKZF1* для стратификации пациентов по группам риска поставлена под сомнение в исследовании итальянских авторов [61]. Делеции в локусе *IKZF1* были оценены методом мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) в группе из 410 детских В-линейных *BCR/ABL1*-негативных ОЛЛ. В общей группе пациенты с делециями *IKZF1* сохраняли сниженную бессобытийную выживаемость и повышенную вероятность рецидива. Пациенты с делециями *IKZF1* неравномерно распределились по группам риска (выделенным согласно стратификации, основанной на оценке уровня МОБ): в группе стандартного риска делеции обнаружены у 8 (6,8 %) из 117 больных, промежуточного — у 42 (15,9 %) из 264 и высокого — у 4 (13,8 %) из 29. Ни у одного из 8 пациентов с делецией в группе стандартного риска не развился рецидив. В группе промежуточного риска пациенты с делециями *IKZF1* имели повышенную частоту рецидивов, но различия не достигли достоверности. Таким образом, прогностическое значение *IKZF1* зависит от применяемого протокола и может не иметь дополнительной ценности для стратификации после разделения на принятые группы риска. Авторы предполагают, что усиленное применение L-аспарагиназы в используемом протоколе могло снизить прогностическую роль гена *IKZF1*. Предпо-

лагается, что комбинирование такого классического прогностического критерия, как уровень МОБ, с анализом мутаций *IKZF1* может значительно улучшить стратификацию пациентов с ОЛЛ по группам риска [62].

Наконец, группа немецких авторов детально изучила прогностические факторы для первого костномозгового рецидива В-линейного ОЛЛ у детей [63]. С использованием метода MLPA была выявлена высокая частота делеций *IKZF1* (33,3 %). Анализ бессобытийной и общей выживаемости показал достоверно худший исход у пациентов с делецией *IKZF1*. Различия особенно велики для пациентов в группе высокого риска, для получивших аллотрансплантацию костного мозга, а также для больных с низким уровнем МОБ. Многофакторный анализ показал, что независимыми неблагоприятными факторами для рецидивов ОЛЛ выступают только делеции гена *IKZF1* и мутации в гене опухолевого супрессора *TP53*.

Некоторые факты свидетельствуют о вкладе Ikaros в развитие лекарственной устойчивости лейкозов [64]. I. Iacobucci et al. (2008) впервые провели анализ связей между наличием молекулярных нарушений гена *IKZF1* и устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназ (ИТК) у пациентов с *BCR/ABL1*+ ОЛЛ. Короткая изоформа Iκ6 была обнаружена у 49 % исследуемых пациентов, при этом наблюдалась высокая степень корреляции между наличием DN-изоформ Ikaros и уровнем транскриптов *BCR/ABL1*. Для лейкозных клеток пациентов экспрессия коротких изоформ Ikaros была характерна до лечения ИТК и преимущественно на момент рецидива, но не во время ответа на ИТК [65].

Гиперэкспрессия *in vitro* Iκ6 активирует синтез ДНК и ингибирует апоптоз в ИТК-чувствительных клетках. В эксперименте на клеточных линиях F. Zhou et al. (2014) подтвердили гипотезу развития множественной химиорезистентности за счет антиапоптотического эффекта, который наблюдался при гиперэкспрессии короткой изоформы Iκ6 [66].

У *BCR/ABL1*-негативных больных В-ОЛЛ в работе N. A. Vitanza et al. закономерностей между наличием мутаций *IKZF1* и развитием лекарственной устойчивости обнаружено не было. Исследователи предполагают, что плохой прогноз заболевания в данном случае мог быть обусловлен другими генетическими нарушениями или особенностями микроокружения клеток костного мозга [67].

Обобщив данные, можно констатировать, что Ikaros является опухолевым супрессором для лимфоидных опухолей. Мутации, приводящие к утрате функций белка, ассоциированы с неблагоприятным прогнозом заболевания. Анализ структурных аберраций и альтернативного сплайсинга гена *IKZF1* целесообразно включать в диагностические панели всех типов лейкозов и в дальнейшем принимать во внимание при определении МОБ. Более точное прогностическое значение этих признаков еще предстоит выяснить для разных групп пациентов с учетом других генетических маркеров и схемы проводимой химиотерапии.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. OriGene Technologies database. URL: http://www.origene.com/Human_cDNA/SC331775.aspx.
2. Gounari F, Kee B. L. Fingerprinting Ikaros. *Nat Immunol* 2013;14(10):1034–5.
3. Jhanjun L., Perez-Casellas L. A., Savić A. et al. Ikaros isoforms the saga continues. *World J Biol Chem* 2011;2(6):140–5.
4. Molnár A., Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14(12):8292–303.
5. Payne K. J., Nicolas J. H., Zhu J. Y. et al. Cutting edge: predominant expression of a novel Ikaros isoform in normal human hemopoiesis. *J Immunol* 2001;167(4):1867–70.
6. Meleshko A. N., Movchan L. V., Belevtsev M. V., Savitskaja T. V. Relative expression of different Ikaros isoforms in childhood acute leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41(3):278–83.
7. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):162–74.
8. Cortes M., Wong E., Koipally J., Georgopoulos K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 1999;11(2):167–71.
9. Liu M., Whetstone J. R., Payton S. G. et al. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem J* 2004;383(Pt 2):249–57.
10. Zinc finger proteins: From atomic contact to cellular function. S. Iuchi, N. Kuldel (eds.). Landes Bioscience, 2005. P. 201.
11. Song C., Li Z., Erbe A. K. et al. Regulation of Ikaros function by casein kinase 2 and protein phosphatase 1. *World J Biol Chem* 2011;2(6):126–31.
12. Francis O. L., Payne J. L., Su R. J., Payne K. J. Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros. *World J Biol Chem* 2011;2(6):119–25.
13. Schwickert T. A., Tagoh H., Gültekin S. et al. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat Immunol* 2014;15(3):283–93.
14. Georgopoulos K., Moore D. D., Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 1992;258(5083):808–12.
15. Georgopoulos K., Bigby M., Wang J. H. et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79(1):143–56.
16. Winandy S., Wu P., Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 1995;83(2):289–99.
17. Wang J. H., Nichogiannopoulou A., Wu L. et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 1996;5(6):537–49.
18. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A. A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p. (In Russ.)].
19. Sellars M., Kastner P., Chan S. Ikaros in B cell development and function. *World J Biol Chem* 2011;2(6):132–39.
20. Yoshida T., Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol* 2014;100(3):220–9.
21. Osborne B. A. Transcriptional control of T cell development. *Curr Opin Immunol* 2000;12(3):301–6.
22. Rothenberg E. V., Taghon T. Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:601–49.
23. Winandy S. Ikaros to the rescue of TCR- α chain gene rearrangement. *Eur J Immunol* 2013;43(2):314–7.
24. Schmitt C., Tonnelie C., Dalloul A. et al. Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis* 2002;7(3):277–84.
25. Avitahl N., Winandy S., Friedrich C. et al. Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity* 1999;10(3):333–43.
26. Tinsley K. W., Hong C., Luckey M. A. et al. Ikaros is required to survive positive selection and to maintain clonal diversity during T-cell development in the thymus. *Blood* 2013;122(14):2358–68.
27. Yoshida T., Ng S. Y., Zuniga-Pflucker J. C., Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* 2006;7(4):382–91.
28. Ng S. Y., Yoshida T., Zhang J., Georgopoulos K. Genome-wide lineage-specific transcriptional networks underscore Ikaros-dependent lymphoid priming in hematopoietic stem cells. *Immunity* 2009;30(4):493–507.
29. Nutt S. L., Kee B. L. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 2007;26(6):715–25.
30. Smith E., Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *J Leukoc Biol* 2004;75(6):973–81.
31. Ng S. Y., Yoshida T., Georgopoulos K. Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol* 2007;19(2):116–22.
32. Kirstetter P., Thomas M., Dierich A. et al. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 2002;32(3):720–30.
33. Liberg D., Smale S. T., Merkenschlager M. Upstream of Ikaros. *Trends Immunol* 2003;24(11):567–70.
34. Jäger R., Gisslinger H., Passamonti F. et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2010;24(7):1290–8.
35. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24(60):1128–38.
36. Yagi T., Hibi S., Takanashi M. et al. High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood* 2002;99(4):1350–5.
37. Meyer C., Zur Stadt U., Escherich G. et al. Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. *Am J Blood Res* 2013;3(2):165–73.
38. Klein F., Feldhahn N., Herzog S. et al. BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 2006;25(7):1118–24.
39. Mullighan C. G., Miller C. B., Radtke I. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453(7191):110–4.
40. Yuan T., Zhao X. L., Zhang L. X. et al. Expression and clinical significance of IKZF1 gene IK6 isoform in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Hematol* 2013;21(3):539–43.
41. Burmeister T., Gesine B., Gröger D. Germline variants in IKZF1, ARID5B, and CEBPE as risk factors for adult-onset acute lymphoblastic leukemia: an analysis from the GMALL study group. *Haematologica* 2014;99(2):e23–5.
42. Mullighan C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:389–96. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.389.
43. Mullighan C. G., Goorha S., Radtke I. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758–64.
44. Kawamata N., Ogawa S., Zimmermann M. et al. Molecular allelotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* 2008;111(2):776–84.
45. Paulsson K., Cazier J. B., Macdougall F. Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(18):6708–13.
46. Martinelli G., Iacobucci I., Storlazzi C. T. et al. IKZF1(Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence

- of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5202–7.
47. Mullighan C. G., Su X., Zhang J. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360(5):470–80.
48. Den Boer M. L., van Slegtenhorst M., de Menezes R. X. et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10(2):125–34.
49. Okamoto R., Ogawa S., Nowak D. et al. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95(9):1481–8.
50. Iacobucci I., Iraci N., Messina M. et al. IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2012;7(7):e40934.
51. Caye A., Beldjord K., Mass-Malo K. et al. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2013;98(4):597–601.
52. Tokunaga K., Yamaguchi S., Iwanaga E. et al. High frequency of IKZF1 genetic alterations in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2013;91(3):201–8.
53. de Rooij J., Beuling E., Zwaan C. M. et al. IKZF1 deletions in pediatric acute myeloid leukemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition. URL: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper71902.html>.
54. Kastner P., Chan S. Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *World J Biol Chem* 2011;2(6):108–14.
55. Iacobucci I., Storlazzi C. T., Cilloni D. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood* 2009;114(10):2159–67.
56. Roberts K. G., Morin R. D., Zhang J. et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012;22(2):153–66.
57. Boehm V., Lebenatus A., Bartels M. et al. Subclonal IKZF1 deletions indicate a multiclonal evolution in BCR-ABL1-positive B-cell precursor ALL. *Blood* 2013;122(21):1327.
58. Kuiper R. P., Waanders E., van der Velden V. H. et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010;24(7):1258–64.
59. Liu P., Lin Z., Qian S. et al. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms and associated genetic alterations in Chinese adult patients with leukemia. *Ann Hematol* 2012;91(7):1039–49.
60. Mi J. Q., Wang X., Yao Y. et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (II): prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases. *Leukemia* 2012;26(7):1507–16.
61. Palmi C., Valsecchi M. G., Longinotti G. et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica* 2013;98(8):1226–31.
62. Waanders E., van der Velden V. H., van der Schoot C. E. et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79 % of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25(2):254–8.
63. Krentz S., Hof J., Mendioroz A. et al. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013;27(2):295–304.
64. Martinelli G., Iacobucci I., Papayannidis C., Soverini S. New targets for Ph+ leukaemia therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22(3):445–54.
65. Iacobucci I., Lonetti A., Messa F. et al. Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood* 2008;112(9):3847–55.
66. Zhou F., Xu Y., Qiu Y. et al. Ik6 expression provides a new strategy for the therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2014;31(3):1373–9.
67. Vitanza N. A., Zaky W., Blum R. et al. Ikaros deletions in BCR-ABL-negative childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with a distinct gene expression signature but do not result in intrinsic chemoresistance. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61(10):1779–85.

Перспективы терапевтического воздействия на сигнальный путь FGFR

М. Ю. Федянин¹, Д. Н. Хмелькова², Т. С. Серебрянская², Т. А. Никольская², С. А. Тюляндин¹

¹Отделение клинической фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Лаборатория трансляционных исследований и персонализированной медицины Центра живых систем ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»; Россия, 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

Контакты: Михаил Юрьевич Федянин fedianinmi@mail.ru

Одними из наиболее исследуемых в онкологии биомаркеров являются рецепторы к фактору роста фибробластов (FGFR), а также лиганды к фактору роста фибробластов (FGF). Молекулярные изменения в генах различных представителей семейства FGF или FGFR — довольно частое событие при злокачественных новообразованиях. Определение значимости комплекса FGF—FGFR в процессах канцерогенеза и в прогрессировании опухолей различной нозологии послужило толчком к появлению работ, посвященных поиску возможностей лекарственного воздействия на данный сигнальный путь. С точки зрения терапевтического воздействия на сигнальный путь FGFR возможно блокировать не только лиганды FGF и FGFR, но и нижележащие молекулы сигнальных путей, активирующихся под действием FGFR. Число ингибиторов тирозинкиназ, селективно блокирующих FGFR, на данный момент крайне невелико. Как правило, тирозинкиназные ингибиторы обладают широким спектром мишеней. Некоторые из таких ингибиторов уже вошли в клиническую практику лечения диссеминированных опухолей различной локализации, другие еще находятся на стадии клинических испытаний. Всего на сайте клинических испытаний clinicaltrials.gov на август 2014 г. зарегистрировано 74 исследования, посвященных изучению ингибиторов FGFR. Способностью ингибировать FGFR обладает также ряд существующих препаратов в высоких концентрациях — сорафениб, вандетаниб, мотесаниб, однако повышение концентрации этих препаратов ассоциировано с выраженной токсичностью лечения. В рекомендованных же терапевтических концентрациях адекватное блокирование тирозинкиназного домена FGFR сомнительно. В статье уделено внимание таким препаратам, как пазопаниб, нинтеданиб, цедираниб, бриваниб, довитиниб, понатиниб. Рассмотрены результаты терапии ингибиторами FGFR при различных нозологиях: рак молочной железы, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак желудка, рак щитовидной железы, рак легкого, рак яичников. Несмотря на то, что анти-FGFR-терапия находится на раннем этапе клинического изучения в онкологии, уже сейчас видны определенные трудности в реализации данного лечебного подхода, такие как высокая токсичность, не всегда валидированная мишень воздействия, необходимость отбора пациентов в зависимости от активности FGF—FGFR-пути, а также наличия мутаций в генах молекул нижележащих сигнальных путей. В обзоре рассмотрены молекулярные процессы, возникающие при активации комплекса FGF—FGFR, а также пути терапевтического воздействия на данный комплекс, результаты исследований и перспективы применения ингибиторов сигнального пути FGFR.

Ключевые слова: фактор роста фибробластов, рецепторы к фактору роста фибробластов, канцерогенез, моноклональные антитела, ингибиторы тирозинкиназ, клинические исследования, солидные опухоли, пазопаниб, нинтеданиб, понатиниб

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.027–038

Prospects of therapeutic action on FGFR signaling pathway

M. Yu. Fedyanin¹, D. N. Khmelkova², T. S. Serebriyskaya², T. A. Nikolskaya², S. A. Tyulyandin¹

¹Department of clinical pharmacology and chemotherapy, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia;

²Laboratory of Translational Research and Personalized Medicine, Living Systems Center, Moscow Physical and Technical Institute (State University); 9 Institutsky Per., Dolgoprudny, Moscow region, 141700, Russia

Fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) are involved in key cellular functions and cancerogenesis. Nowadays FGFR and their ligands are one of the most investigated markers in oncology and targets for specific therapy. There are a lot of clinical trials in oncology include drugs with anti-FGFR activities. The most of these drugs are tyrosine kinase inhibitors and monoclonal antibodies. When we say about therapeutic effects on the FGFR signaling pathway, we say about opportunity not only block the ligands and FGFRs, but the underlying molecular and signaling pathways activated by FGFRs. Nowadays the number of tyrosine kinase inhibitors selectively blocking FGFRs is extremely small. Typically, tyrosine kinase inhibitors can block a wide range of targets. Some of these inhibitors have entered in clinical practice in the treatment of metastatic tumors of different localizations, others are in clinical trials. On August 2014, 74 studies investigating inhibitors of FGFRs are registered on clinicaltrials.gov. A number of marketed drugs at high concentrations also has the ability to inhibit FGFR — sorafenib, vandetanib, motesanib, however, increasing the concentration of these drugs is associated with severe toxicity of treatment. In the recommended therapeutic concentrations, adequate blocking FGFR tyrosine kinase domain is doubtful. The review paid attention to such drugs as pazopanib, nintedanib, cediranib, brivanib, dovitinib, ponatinib. We showed the results of treatment with inhibitors of FGFR in different cancers such as breast cancer, colon cancer, endometrial cancer, gastric cancer, thyroid cancer, lung cancer, ovarian

cancer. Despite the fact that anti-FGFR therapy are at an early stage of clinical investigation, some difficulties in implementing this therapeutic approach have been seen, such as high toxicity, not validated targets, the need for patient selection, depending on the activity of FGF–FGFR pathway, as well as mutations in genes of downstream molecular signaling pathways.

In summary in the article we reviewed relevant literature to identify current status, difficulties and future perspectives in development of anti-FGFR drugs. In this article, we review FGFR signaling and describe the therapeutic intervention in patients with solid tumors.

Key words: solid tumors, fibroblast growth factor receptor, fibroblast growth factors, cancerogenesis, monoclonal antibodies, tyrosine kinase inhibitors, clinical trials, pazopanib, nintedanib, ponatinib

Введение

Одними из наиболее исследуемых в онкологии биомаркеров являются рецепторы к фактору роста фибробластов (fibroblast growth factor receptors, FGFR), а также лиганды к нему (fibroblast growth factor, FGF). При этом молекулярные изменения в генах различных представителей семейства FGF или FGFR могут быть обусловлены появлением активирующих мутаций, транслокаций или амплификаций. Кроме этого, выявляются альтерации в различных изоформах FGFR, нарушение экспрессии корецепторов, подавление активности негативных регуляторов FGFR. Возможности терапевтического воздействия на сигнальный путь FGFR позволяют блокировать не только FGF и FGFR, но и нижележащие молекулы сигнальных путей, активирующихся под действием FGFR. В данном обзоре будут рассмотрены молекулярные процессы, возникающие при активации комплекса FGF–FGFR, а также пути терапевтического воздействия на данный комплекс, результаты исследований и перспективы применения ингибиторов сигнального пути FGFR.

Факторы роста фибробластов, их рецепторы и сигнальные пути

Семейство человеческого FGF включает 22 белковых молекулы. По принципу действия их можно разделить на следующие группы:

- лиганды к FGFR: FGF1–10, 16–23;
- лиганды, обладающие ауто- и/или паракринным действием: FGF1–10, 16–18, 20, 22;
- лиганды, функционирующие как гормоны: FGF19, 21, 23;
- факторы, не способные связываться с рецепторами, также известные как FGF-гомологичные факторы: FGF11–14. Они действуют внутри клеток. Предполагается, что белки этой группы участвуют в регуляции работы мембранных натриевых каналов [1, 2].

FGF – многофункциональные белки, играющие важнейшую роль как в эмбриогенезе, так и в жизнедеятельности взрослого организма. Они участвуют в процессах дифференцировки и пролиферации клеток различных типов, а также в регуляции клеточной миграции и выживания, регенерации тканей, в процессах ангиогенеза и нейрогенеза. Множество данных также свидетельствует о том, что нарушенный сигнальный путь FGF может приводить к развитию опухолей [3, 4].

FGF воздействуют на клетки через группу рецепторов (FGFR). У человека описано 4 функционально активных рецептора к семейству белков FGF (FGFR1–4). У пятого рецептора, FGFR5, отсутствует тирозинкиназный домен, в связи с чем он, будучи способным связывать молекулы FGF, не проводит сигнал внутрь клетки, выступая, таким образом, как негативный регулятор сигнального пути FGF [3, 5].

FGF – это секретируемые гликопротеиды, однако их локализация может быть различной: они обнаруживаются как во внеклеточном матриксе, так и в цитоплазме, а также в ядре клетки. Находясь в экстрацеллюлярном пространстве, FGF образуют комплексы с гепаринсульфат-протеогликанами (ГСП) матрикса. Взаимодействие с рецептором на поверхности клетки возможно только при высвобождении молекулы FGF из комплекса с ГСП; этот процесс обеспечивается гепариназами и протеазами внеклеточного матрикса. После высвобождения молекула FGF связывается с ГСП на мембране клетки, что облегчает дальнейшее образование лиганд-рецепторного комплекса с FGFR [3].

Обнаружение FGF (а также их рецепторов) в ядре клетки позволило предположить, что они также могут регулировать процессы жизнедеятельности клеток через механизмы, отличные от классического тирозинкиназного сигнального пути [6, 7].

Наиболее изученными представителями описанного семейства факторов роста являются FGF1 и FGF2. FGF1 – единственный фактор из всего семейства, который с высокой аффинностью способен связываться со всеми изоформами FGFR; все остальные FGF проявляют специфичность к изоформам FGFR. FGF1 играет роль в процессах ангиогенеза и адипогенеза [5, 8].

FGF2 вовлечен в регуляцию основных процессов существования клетки: пролиферации, дифференцировки, выживания, клеточной адгезии, миграции, подвижности и апоптоза. *In vivo* FGF2 регулирует процессы формирования конечностей, заживления ран, ангиогенеза, васкулогенеза и ремоделирования кровеносных сосудов, а также участвует в процессах канцерогенеза. FGF2 проявляет митогенную и хемоаттрактивную активность в отношении эндотелиоцитов и клеток гладкой мускулатуры сосудов, а также активирует пролиферацию перицитов. Следует отметить, что FGF2 стимулирует образование активатора плазминогена и экспрессию металлопротеиназ, играя важную роль в процессах сосудистой стабилизации и моделирования экстрацеллюлярного матрикса [5, 8].

Однако его активность проявляется лишь в совокупности с работой других факторов. Показано, что при выключении гена *FGF2* у мышей сохраняется способность к нормальному ангиогенезу, отмечаются незначительные нарушения в формировании скелета и сердечно-сосудистой и нервной систем [9, 10].

Различные эффекты белков семейства FGF на клетку определяются лиганд-специфичностью соответствующих рецепторов и их изоформ, а также тканеспецифичностью их экспрессии. Структурно молекула рецептора состоит из экстрацеллюлярной части, включающей в себя 3 иммуноглобулин-подобных домена, способных связываться с FGF, трансмембранного перешейка и цитоплазматического внутриклеточного тирозинкиназного домена. В результате альтернативного сплайсинга третьего иммуноглобулин-подобного домена образуются 2 группы изоформ FGFR: IIIВ и IIIС.

Исключение составляет FGFR4, который экспрессируется только в виде изоформы IIIС. Интересно отметить, что экспрессия изоформ рецепторов имеет тканеспецифичный характер. Так, изоформы IIIВ обнаружены преимущественно в эпителиальных тканях, тогда как изоформы IIIС характерны для клеток соединительной ткани. Большинство из FGF могут активировать несколько рецепторов, за исключением FGF7, который способен связываться только с IIIВ-изоформой FGFR2 [3, 5].

FGF осуществляют свои функции в клетке через классический сигнальный путь, включающий в себя активацию сигнальных каскадов PI3K/AKT, MAPK, PLCγ, а также транскрипционных факторов STAT (рис. 1). После связывания с лигандом FGFR могут формировать как гомодимеры, так и гетеродимеры. Димеризация рецептора и интернализация лиганда необходимы

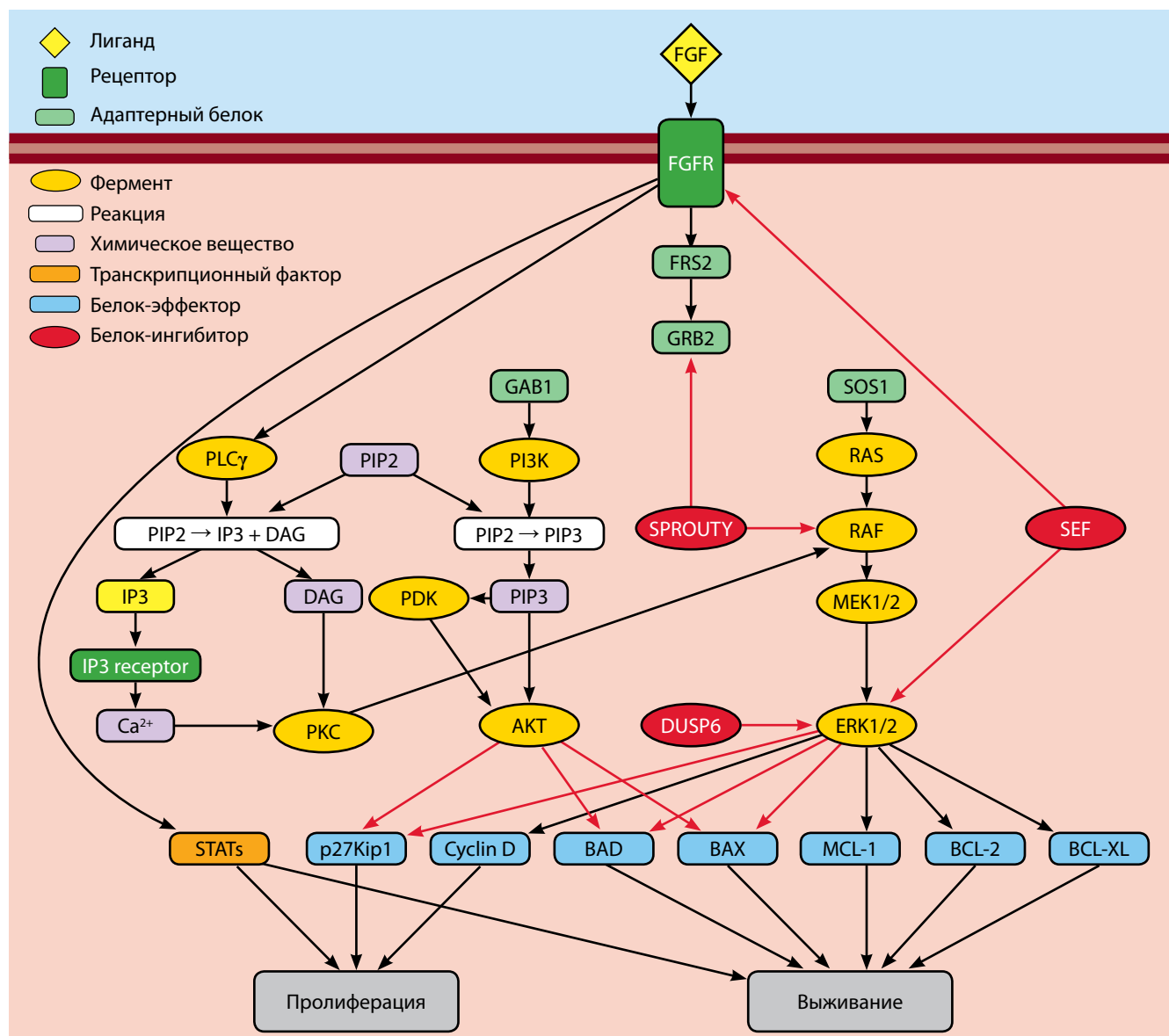


Рис. 1. Сигнальный путь FGF

для дальнейшей передачи FGF-сигнала в клетку. В данных процессах участвуют ГСП, экспрессированные на мембране клетки (например, синдеканы и глипиканы) [3, 11]. Связывание лиганда с рецептором приводит к димеризации FGFR и последующей активации его тирозинкиназного домена. Остатки тирозина в киназном домене служат местом посадки адаптерных белков, главным из которых является FRS2. Связывание FRS2 с FGFR приводит к фосфорилированию адаптерной молекулы за счет киназной активности рецептора. Фосфорилирование FRS2 в свою очередь приводит к активации MAPK-каскада RAS–RAF–MEK1/2–ERK1/2 через дополнительные адаптерные молекулы GRB2 и SOS1, а также к активации фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) через адаптер GAB1. PI3K в свою очередь запускает реакцию образования фосфатидилинозитол-3-фосфата (PIP3) из фосфатидилинозитол-2-фосфата (PIP2). PIP3 совместно с киназой PDK активирует еще одну киназу – АКТ [3, 12, 13]. Активация пути RAS–RAF–MEK–ERK приводит к усилению экспрессии циклина D [3, 14–16]. Кроме того, активация как пути RAS–ERK, так и пути PI3K–АКТ ведет к подавлению активности ингибитора циклин-зависимой киназы p27^{KIP1} [17, 18]. Это определяет усиление пролиферации клетки. Активация как пути RAS, так и пути PI3K способствует выживанию клетки в стрессовых условиях в результате ингибирования апоптотических белков, таких как BAD и BAX [3, 19, 20]. Кроме этого, клетка «ускользает» от апоптоза путем активации антиапоптотических белков MCL-1, BCL-2 и BCL-XL [3, 19, 21].

Адаптер-независимым путем происходит взаимодействие между остатками тирозина в киназном домене FGFR и SH2-доменом фосфолипазы C γ , что приводит к ее активации [22]. Данная фосфолипаза катализирует реакцию превращения PIP2 в инозитол-3-фосфат (IP3) и диацилглицерол (DAG). IP3 связывается со своим рецептором в мембране эндоплазматического ретикула (ЭПР), что в итоге приводит к открытию кальциевых каналов и выходу ионов кальция из ЭПР в цитоплазму. DAG и кальций необходимы для активации протеинкиназы C, которая в свою очередь способствует дополнительной активации MAPK-пути за счет фосфорилирования RAF [3]. Четвертый сигнальный путь, который могут активировать FGFR, – STAT (signal transduction and activation of transcription), приводящий к экспрессии генов, ответственных за такие клеточные процессы, как рост, дифференцировка, апоптоз [3, 23].

В регуляции активности сигналов FGFR участвуют различные молекулы:

- DUSP6 (инактивирует ERK);
- белок SPROUTY (ингибирует GRB2 и RAF (BRAF и/или CRAF), приводя к инактивации пути RAS–ERK);
- SEF (подавляет фосфорилирование FGFR, ингибирует ERK) [24–26].

В норме FGFR отвечают за развитие костно-суставной системы у позвоночных, участвуя в регуляции дифференцировки и пролиферации остеобластов и хондроцитов. Повышенная активность сигнального пути FGF у эмбрионов и детей приводит к развитию аномалий скелета, включая карликовость и краниосиностозные синдромы, ахондроплазии. Во взрослом организме FGF вовлечены в процессы физиологического и патологического ангиогенеза. Нарушения в системе FGF–FGFR наблюдаются также при болезни Альцгеймера, мышечной дистрофии Дюшенна, диабетической ретинопатии, атеросклерозе [27].

В большом количестве работ отмечаются изменения активности лиганд-рецепторного комплекса FGF–FGFR в опухолевых клетках. При этом гиперэкспрессия различных представителей семейств FGF и FGFR может быть обусловлена появлением активирующих мутаций, транслокаций или амплификаций соответствующих генов. Также выявлены альтерации в различных изоформах FGFR, нарушения экспрессии корецепторов, подавление активности негативных регуляторов FGFR – например, SPROUTY [28].

Изменения в системе FGF–FGFR наиболее выражены при таких злокачественных опухолях, как рак мочевого пузыря, рак молочной железы (РМЖ), рак толстой кишки. Более подробно об изменениях в системе FGF–FGFR рассказано в обзоре [29]. Значимость изменений в комплексе FGF–FGFR в процессе канцерогенеза определяет актуальность и необходимость изучения путей терапевтического воздействия на данный комплекс. Ниже представлены результаты исследований и перспективы применения ингибиторов сигнального пути FGFR.

Ингибиторы тирозинкиназ FGFR

В настоящее время основными препаратами таргетной терапии являются моноклональные антитела к рецепторам и их лигандам, а также малые молекулы, ингибирующие тирозинкиназную активность белков, в том числе рецепторов. Число ингибиторов тирозинкиназ, селективно блокирующих FGFR, на данный момент крайне невелико. Как правило, тирозинкиназные ингибиторы обладают широким спектром мишеней. Некоторые из таких ингибиторов уже вошли в клиническую практику лечения диссеминированных опухолей различной локализации, другие еще находятся на стадии клинических испытаний (таблица, рис. 2). Всего на сайте клинических испытаний clinicaltrials.gov на август 2014 г. зарегистрировано 74 исследования, посвященных изучению ингибиторов FGFR.

Ряд существующих препаратов в высоких концентрациях также обладают способностью ингибировать FGFR – сорафениб, вандетаниб, мотесаниб, однако повышение концентрации этих препаратов ассоциировано с выраженной токсичностью лечения. В рекомендованных же терапевтических концентрациях

Препараты, одной из мишеней которых является FGFR

Препарат	Производитель	Спектр рецепторов-мишеней	Стадия разработки
Пазопаниб	GSK	VEGFR1–3, PDGFR, FGFR, CSF1R	В клинике
Понатиниб	ARIAD Pharmaceuticals	BCR–ABL, FGFR	В клинике
Цедираниб	AstraZeneca	VEGFR1–3, KIT, PDGFR, FGFR, Src, CSF1R	III фаза
Бриваниб аланинат	BMS	VEGFR2, FGFR1–3	III фаза
Нинтеданиб (BIBF1120)	Boehringer Ingelheim	VEGFR1–3, FGFR1–3, PDGFR α , β , Src, Lck, Lyn	III фаза
Довитиниб	Chiron/Novartis	FGFR, FLT3, KIT, PDGFR, VEGFR	III фаза
Маситиниб	AB Science	KIT, PDGFR, FGFR	III фаза
AZD4547	AstraZeneca	FGFR	II фаза
CP-547632	OSI/Pfizer	VEGFR2, FGFR	II фаза
Люцитаниб	Clovis Oncology, Inc	VEGFR, FGFR, PDGFR	II фаза
BGJ398	Novartis Pharmaceuticals	FGFR	II фаза
Данусертиб	NMS Oncology	Aurora A/B/C, Abl, TrkA, RET, FGFR1	II фаза
XL999	Symphony Evolution, Inc	VEGFR2, PDGFR β , FLT3, FGFR1,3, RET, KIT	II фаза
Orantinib (TSU-68)	Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.	VEGFR, PDGFR, FGFR	II фаза
ARQ 087	ArQule	FGFR	I фаза
XL228	Exelixis	IGF1R, Src, FGFR, BCR–ABL	I фаза
Sulfatinib (HMPL-012)	Hutchison MediPharma, Ltd	VEGFR1–3, FGFR	I фаза
R-1530	Roche	VEGFR, FGFR, PDGFR	I фаза
Debio-1347	Debiopharm International SA	FGFR	I фаза
BAY1163877	Bayer	FGFR	I фаза
JNJ-42756493	Janssen Research & Development, LLC	FGFR	I фаза
PD173074	Pfizer	FGFR1	I фаза
E7080 (ленватиниб)	Eisai	FGFR, PDGFR, VEGFR	I фаза
FP-1039	Five Prime Therapeutics, Inc	FGF (моноклональное антитело)	II фаза
BAY1179470	Bayer	FGFR2 (моноклональное антитело)	I фаза
GSK3052230	GlaxoSmithKline	FGFR1 (моноклональное антитело)	I фаза

адекватное блокирование тирозинкиназного домена FGFR сомнительно. Большинство ингибиторов тирозинкиназ способны подавлять фосфорилирование тирозинкиназ различных молекул. В связи с этим блокируется не только FGFR, но зачастую также VEGFR и PDGFR, что обусловлено схожестью тирозинкиназных доменов данных рецепторов. Это, с одной стороны, усиливает эффект препаратов, а с другой – расширяет спектр осложнений лечения.

Ряд препаратов был исключен из исследований в связи с неприемлемой токсичностью. Так, препарат XL999 в I фазе клинических испытаний показал выраженную сердечную токсичность. Другой препарат (PD173074), обратимый ингибитор тирозинкиназ

FGFR1–3, проявил выраженную антипролиферативную активность на FGFR2-экспрессирующих клеточных линиях рака эндометрия [30], рака желудка [31, 32], однако показал неприемлемую токсичность [32]. Классический спектр осложнений, характерных для ингибиторов FGFR, хорошо иллюстрируют результаты I фазы испытаний препарата TKI-258 (довитиниб – мультитирозинкиназный ингибитор VEGFR, PDGFR, FGFR1–3, FLT3 и KIT). Спектр побочных явлений включал слабость, артериальную гипертензию, тошноту, рвоту, отсутствие аппетита, диарею. Часть осложнений купировались назначением сопроводительной терапии, другие осложнения удалось скорректировать за счет снижения дозы препарата [33].

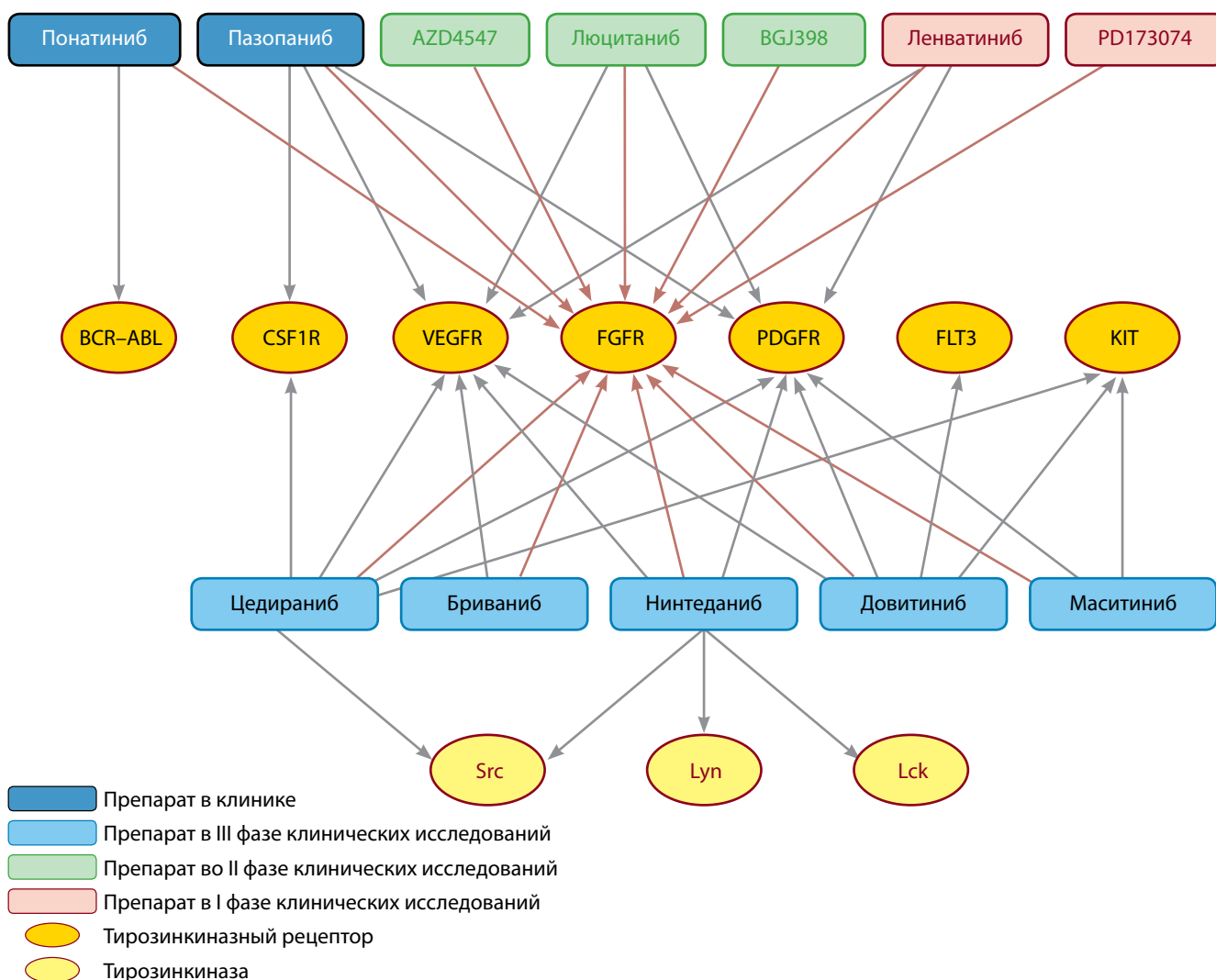


Рис. 2. Перспективные ингибиторы тирозинкиназ и их мишени

В ряде случаев исследования, для которых шел отбор пациентов по наличию мутации в генах *FGFR*, закрывались досрочно в связи с крайне медленным набором. К примеру, в исследование препарата FP-1039 предполагалось включать больных раком эндометрия с мутациями в гене *FGFR2*. Из 70 скринированных пациенток никого не удалось включить в исследование (clinicaltrials.gov).

Рассмотрим эффективность уже зарегистрированного препарата с анти-*FGFR*-действием — пазопаниба. В настоящее время пазопаниб зарегистрирован для применения в 1-й линии лечения больных диссеминированным раком почки, а также пациентов с рефрактерными к химиотерапии саркомами мягких тканей. В 2010 г. были представлены результаты II фазы исследования терапии пазопанибом больных метастатическим РМЖ. Большинство больных (70 %) имели гормонопозитивные опухоли. Отметим, что именно при этом подтипе РМЖ чаще всего выявляются изменения в системе FGF–*FGFR* [29]. Медиана числа линий химиотерапии до начала лечения пазопанибом

составила 2. Препарат показал не впечатляющие результаты: объективный ответ наблюдался лишь у 5 % больных, медиана времени до прогрессирования составила 5,3 мес. Поданализ в зависимости от статуса гена *FGFR* не проводился [34]. Кроме того, опубликованы результаты рандомизированного исследования II фазы по применению комбинации пазопаниба или плацебо с лапатинибом или монотерапии пазопанибом у больных метастатическим РМЖ с гиперэкспрессией рецептора HER-2/neu с прогрессированием после как минимум 1 линии химиотерапии. Применение комбинации пазопаниба и лапатиниба было ассоциировано с повышением частоты объективных ответов опухоли, но не с увеличением времени до прогрессирования в сравнении с монотерапией лапатинибом. Применение комбинированного режима также было ассоциировано с увеличением числа осложнений III–IV степени и, как следствие, более частым снижением дозы препаратов [35].

В настоящее время зарегистрировано 16 исследований пазопаниба при РМЖ, часть из которых

уже завершена. При этом ни в одном из них не проводился отбор пациентов с гиперэкспрессией белков FGFR в опухоли. Только в одном исследовании ставилась задача изучения пациенток с гормонально-зависимым заболеванием (пазопаниб + экземестан), однако оно было закрыто еще до начала включения больных. В связи с тем, что таргетная терапия воздействует на опухоль при наличии в ней мишени, для всей популяции пациентов она может оказаться незначимо эффективной. Принимая во внимание распространенность нарушений в системе FGF–FGFR, особенно при дольковом РМЖ, а также при развитии резистентности к гормонотерапии [29], нам видится, что именно эта популяция больных должна рассматриваться в качестве мишени для разработки препаратов целенаправленного действия против FGFR.

При раке толстой кишки проведено 2 исследования I фазы: комбинации пазопаниба и FOLFOX/XELOX и режима пазопаниб + иринотекан + цетуксимаб. Доступны результаты первого исследования. Доказав удовлетворительную переносимость изучаемой комбинации, авторы отметили, что частота объективных ответов для режима пазопаниб + FOLFOX составила 40 %, для комбинации пазопаниба с режимом XELOX – 38 % [36]. При этом только 16 % больных получали предшествующую химиотерапию. Таким образом, добавление пазопаниба к химиотерапии больных раком толстой кишки значимо не улучшило результаты лечения. В настоящее время не зарегистрировано других исследований с пазопанибом при раке толстой кишки. Интересным видится более персонализированный подход для отбора пациентов в исследование: при прогрессировании после оксалиплатин-содержащей химиотерапии 1-й линии в случае наличия гиперэкспрессии белка FGFR4 вновь исследовать эффективность режима FOLFOX/XELOX в комбинации с пазопанибом.

Еще одним хорошо изученным препаратом с анти-FGFR-активностью является препарат бриваниб. Это ингибитор тирозинкиназ рецепторов VEGFR, PDGFR, FGFR. При изучении препарата на ксенографтных моделях гормонопозитивного РМЖ схема тамоксифен + бриваниб оказывала более выраженное антипролиферативное действие, нежели монотерапия каждым из препаратов [37]. При этом на группе клеток с гиперэкспрессией белка FGFR1 бриваниб был более эффективным, оказывая прямой антипролиферативный, а не только антиангиогенный эффект [38]. В настоящее время клинических исследований с бриванибом при РМЖ не зарегистрировано. В исследовании III фазы у больных с метастатическим рефрактерным раком толстой кишки с диким типом гена *KRAS* проведено сравнение комбинации цетуксимаба с бриванибом или плацебо. В исследование были включены 750 больных. Медиана продолжительности жизни составила 8,8 мес в группе с бриванибом и 8,1 мес в груп-

пе с плацебо (относительный риск (ОР) 0,88; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,74–1,03; $p = 0,12$). Медиана времени до прогрессирования составила 5,0 и 3,4 мес соответственно (ОР 0,72; 95 % ДИ 0,62–0,84; $p < 0,0001$). И частичные ответы (13,6 против 7,2 %; $p = 0,004$), и стабилизация (50 против 44 %) наблюдались чаще в группе с бриванибом. Частота осложнений $\geq$ III степени была выше в группе комбинации цетуксимаба с бриванибом (78 против 53 %). У пациентов, получавших бриваниб, чаще развивались астения (25 %), артериальная гипертензия (11 %) и сыпь (10 %) [39]. Назначение бриваниба всем больным не привело к улучшению выживаемости. В 2011 г. было инициировано исследование комбинации бриваниба и иринотекана у больных метастатическим раком толстой кишки с высоким уровнем FGF в плазме крови. Однако исследование было прекращено спонсором без объяснения причины (clinicaltrials.gov). Добавление бриваниба к режимам FOLFOX и FOLFIRI неожиданно для исследователей привело к большому числу тромботических осложнений [40].

Цедираниб – это тирозинкиназный ингибитор, который наряду с FGFR, VEGFR1–3 блокирует еще и KIT. В исследовании HORIZON II в качестве 1-й линии терапии метастатического рака толстой кишки было проведено сравнение режимов FOLFOX/XELOX + цедираниб и FOLFOX/XELOX + плацебо. Заключительные результаты исследования не показали статистически значимых различий между группами с цедиранибом и плацебо в отношении показателей продолжительности жизни (ОР 0,94; $p = 0,571$) [41]. Однако препарат, возможно, займет свою нишу в лечении больных раком яичников – получены обнадеживающие результаты в III фазе исследования [42], хотя, по-видимому, противоопухолевый эффект при раке яичников препарат оказывает за счет своего антиангиогенного, а не анти-FGFR-действия.

BIBF1120 (нинтеданиб) – мультитаргетный ингибитор тирозинкиназ, который наряду с блокированием VEGFR1–3 и FGFR2 оказывает воздействие и на такие мишени, как киназы Lck, Lyn и Src. В ряде исследований I фазы при ежедневном приеме препарата в качестве дозолимитирующей токсичности выступало транзиторное повышение трансаминаз печени. Другими наиболее часто встречающимися осложнениями были реакции со стороны желудочно-кишечного тракта: тошнота, рвота, диарея и астения. Отмечены длительные периоды стабилизации при различных опухолях – до 4–11 мес [43–47]. Интересные результаты были достигнуты и во II фазе исследования в комбинации с химиотерапевтическими режимами при немелкоклеточном раке легкого и раке яичников [48, 49]. В работах I/II фазы отмечена приемлемая переносимость и эффективность комбинации BIBF1120 с бевацизумабом при раке толстой кишки. Однако в комбинации с афатинибом при раке толстой кишки или в комбинации с EGFR-ингибитором (BIBW2992)

при раке предстательной железы препарат не показал значимых эффектов [50, 51]. В настоящее время в онкологии зарегистрировано 4 исследования III фазы с препаратом BIBF1120:

- комбинация с доцетакселом во 2-й линии терапии немелкоклеточного рака легкого;
- комбинация с пеметрекседом во 2-й линии терапии немелкоклеточного рака легкого;
- комбинация с паклитакселом и карбоплатином в 1-й линии терапии рака яичников;
- в монорежиме при химиорефрактерном раке толстой кишки.

В исследовании III фазы при раке яичников добавление исследуемого препарата не привело к увеличению выживаемости больных [52]. Между тем при применении его в комбинации с доцетакселом во 2-й линии лечения больных немелкоклеточным раком легкого время до прогрессирования было статистически значимо выше, чем в случае комбинации доцетаксела с плацебо. Однако риск смерти для всей исследуемой популяции больных в группе с BIBF1120 снизился лишь на 6 % (ОР 0,94; $p = 0,2$) [53]. При этом ни в исследованиях I фазы, ни в 25 проводящихся исследованиях II фазы и 4 исследованиях III фазы не применяется дифференцированный отбор пациентов по экспрессии предполагаемых мишеней воздействия препаратов, в том числе и FGF–FGFR.

Большие надежды возлагались на препарат довитиниб, имеющий другой спектр мишеней, — наряду с FGFR он блокирует FLT3, KIT и CSF1R. Наиболее часто встречаемый вариант осложнений терапии довитинибом — слабость и гастроинтестинальная токсичность [33]. На ESMO 2014 были представлены результаты исследования довитиниба у больных раком эндометрия во 2-й линии лечения в зависимости от наличия мутации в гене *FGFR2*. Для включения в исследование 31 пациентки с диким типом гена *FGFR2* и 22 больных с мутацией в гене было скринировано 248 пациенток. Частота выявления мутаций составила 11 %. Статистический дизайн предполагал, что имеет смысл продолжать набор больных, если хотя бы у 8 из первых 20 пациенток, включенных в исследование, время до прогрессирования составит более 18 нед. Однако только у 5 пациенток в группе без мутации и у 7 в группе с мутацией была достигнута выживаемость без прогрессирования 18 нед. В связи с этим исследование было прекращено. Однако были получены неожиданные результаты: объективный эффект от применения ингибитора *FGFR2* (довитиниба) оказался выше в группе больных без мутации в гене *FGFR2* (16 против 5 %), время до прогрессирования не различалось между группами. Тем не менее медиана продолжительности жизни была выше в группе с мутацией (20,2 против 9,3 мес). У 68 % больных развившиеся побочные эффекты потребовали перерыва в терапии довитинибом или снижения дозы препарата. Основной причиной прекращения лечения в связи

с токсичностью явились тромбоэмболические осложнения. С одной стороны, препарат показал активность у больных раком эндометрия, с другой — роль мишени (мутация *FGFR2*), на которую должен был бы воздействовать препарат, не подтвердилась [54]. Результаты исследования II фазы довитиниба у больных РМЖ, положительным по рецепторам эстрогенов (ER), с гиперэкспрессией FGFR оказались не впечатляющими. Однако отмечена некоторая тенденция к большей эффективности препарата при амплификации гена *FGFR* [55]. В настоящее время препарат исследуется при РМЖ, раке мочевого пузыря, почки, множественной миеломе.

В ходе изучения эффективности тирозинкиназных ингибиторов при РМЖ был отмечен выраженный антипролиферативный эффект на клеточных линиях РМЖ с амплификацией генов *FGFR1* или *FGFR2* при применении препаратов PD173074 и TKI168 [16, 56]. Перспективным видится и комбинированное ингибирование FGFR и HER-2/neu, гиперэкспрессия которых наблюдается зачастую симультанно при РМЖ. В ряде предклинических работ была показана эффективность данного воздействия на клеточные линии опухоли [57]. Также в настоящее время продолжается исследование II фазы препарата люцитаниба (мультикиназный ингибитор VEGFR, FGFR, PDGFR) у больных с ER-положительным РМЖ в зависимости от экспрессии FGFR1 в опухоли [58].

К ингибиторам FGFR также относится препарат понатиниб, показывающий более значимую (в 2–13 раз выше) ингибирующую активность в сравнении с бриванибом, цидиранибом, довитинибом и BIBF1120. При этом препарат оказывает выраженный антипролиферативный эффект при различных опухолях *in vitro* [59].

Препарат ленватиниб, относящийся к тирозинкинажным ингибиторам VEGFR и FGFR, показал обнадеживающие результаты в терапии больных раком щитовидной железы [60]. В настоящее время проводится изучение препарата в рамках III фазы исследования при данной патологии. Также препарат проходит апробацию при меланоме и гепатоцеллюлярном раке.

Интересными молекулами, селективно ингибирующими FGFR1–4, являются препараты AZD4557 и BJC398. Эти препараты оказывают выраженный антипролиферативный эффект в большинстве клеточных линий опухолей с гиперэкспрессией компонентов FGF–FGFR [61]. В настоящее время проводятся исследования I/II фазы с AZD4557 при РМЖ и раке желудка с гиперэкспрессией FGFR1 и 2. Молекула BJC398 находится на I фазе изучения [61, 62].

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела связывают либо лиганд, либо экстрацеллюлярную часть рецептора и действуют более селективно, нежели ингибиторы тирозинкиназ. В связи с этим предполагается, что их

применение будет ассоциировано с меньшей токсичностью и более высокой эффективностью. В настоящее время исследуются как моноклональные антитела к FGF, так и антитела к FGFR. Более того, есть возможность создать антитела, специфически связывающие определенный тип и даже изоформу FGFR. Моноклональные антитела к FGFR3 показали антипролиферативную активность в отношении клеточных линий уротелиального рака [63] и множественной миеломы с гиперэкспрессией мембранной формы FGFR3. При этом активность в отношении клеток, не экспрессирующих рецептор FGFR3 на мембране, была минимальной [64].

Примером моноклонального антитела к FGF служит FP1039 – белковая молекула, состоящая из внеклеточной части FGFR1-IIIc и Fc-домена иммуноглобулина G1. Данный препарат способен предотвращать связывание различных FGF с их рецепторами. При этом FP1039 показывает антипролиферативный и антиангиогенный эффект на клеточных линиях злокачественных опухолей [65].

Интересно отметить, что в гематологии зарегистрирован препарат, активирующий FGFR, – реком-

бинантный лиганд FGF7. Показанием к его назначению являются мукозиты, вызванные химиотерапией при трансплантации стволовых клеток.

Проблемы селективного ингибирования комплекса FGF–FGFR

Разработка лекарственных препаратов, нацеленных на селективное ингибирование FGFR и FGF, является важной задачей современной онкологии. Однако, даже будучи введенными в клиническую практику, подобные препараты могут иметь ограниченную эффективность при лечении пациентов с мутациями в нижележащих молекулах сигнальных путей, активирующихся под действием FGFR. Два важнейших сигнальных пути, запускаемых комплексом FGF–FGFR, – это PI3K/AKT и Ras/Raf/MEK/ERK [3]. Согласно базе данных соматических мутаций при раке COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>), частота встречаемости мутаций в генах этих сигнальных путей весьма высока в различных типах злокачественных опухолей (рис. 3). Так, частота встречаемости мутаций в гене *KRAS* может достигать

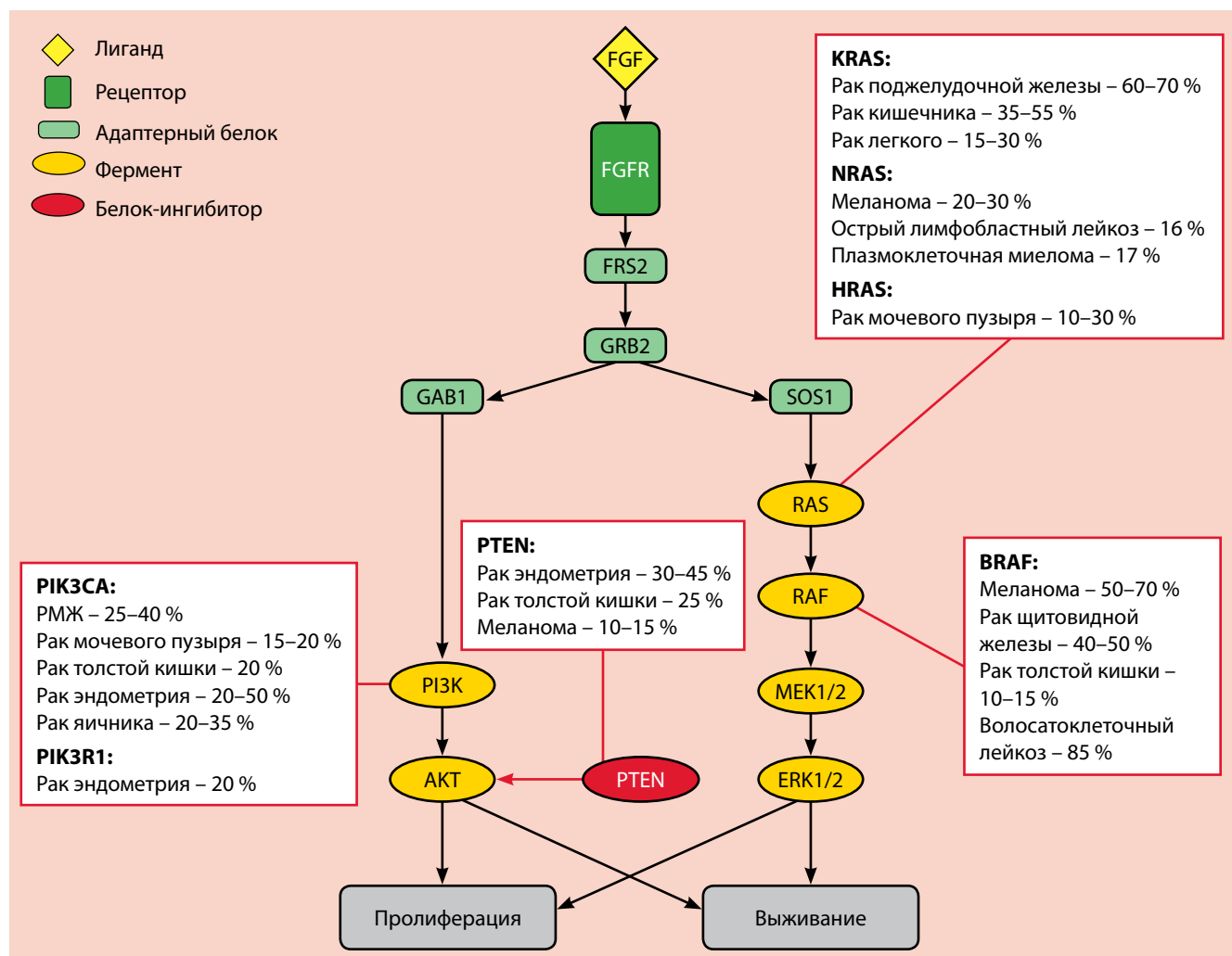


Рис. 3. Наиболее часто встречающиеся мутации в генах сигнальных путей EGFR при разных типах рака

70 % при раке поджелудочной железы и 55 % при раке толстой кишки. Частота встречаемости мутаций в гене *BRAF* при меланоме составляет 50–70 %. Мутации в гене *PI3K* встречаются с достаточно высокой частотой при различных типах рака. Кроме того, для различных опухолей характерны также мутации в гене *PTEN*, являющемся негативным регулятором пути *PI3K/АКТ*. Подобные цифры позволяют предположить, что, помимо задачи разработки эффективных ингибиторов *FGF* и *FGFR* для лечения онкологических заболеваний, перед исследователями может также встать задача преодоления резистентности к такой терапии у пациентов, являющихся носителями мутаций в белках нижележащих сигнальных путей.

Заключение

Определение значимости комплекса *FGF–FGFR* в канцерогенезе и прогрессировании опухолей различной нозологии послужило толчком к появлению работ,

посвященных поиску возможностей лекарственного воздействия на данный сигнальный путь. С точки зрения терапевтического воздействия на сигнальный путь *FGFR* возможно не только блокировать лиганды и рецепторы к *FGF*, но и нижележащие молекулы сигнальных путей, активирующихся под действием *FGFR*. Несмотря на то, что анти-*FGFR*-терапия находится на раннем этапе клинического изучения в онкологии, уже сейчас видны определенные трудности в реализации данного лечебного подхода, такие как высокая токсичность, не всегда валидированная мишень воздействия, необходимость отбора пациентов в зависимости от активности *FGF–FGFR*-пути, а также в зависимости от наличия мутаций в молекулах нижележащих сигнальных путей. Однако улучшение фармацевтической составляющей в создании препаратов с избирательной анти-*FGFR*-активностью и развитие методов ранней молекулярной диагностики позволит преодолеть все сложности.

ЛИТЕРАТУРА

- Itoh N. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol Pharm Bull* 2007;30(10):1819–25.
- 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.
- Turner N., Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10(2):116–29.
- Katoh M., Nakagama H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev* 2014;34(2):280–300.
- Beenken A., Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(3):235–53.
- Bryant D. M., Stow J. L. Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic* 2005;6(10):947–54.
- Imamura T., Engleka K., Zhan X. et al. Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 1990;249(4976):1567–70.
- Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997;18(1):26–45.
- Miller D. L., Ortega S., Bashayan O. et al. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000;20(6):2260–8.
- Dono R., Texido G., Dussel R. et al. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J* 1998;17(15):4213–25.
- Simons M., Horowitz A. Syndecan-4-mediated signalling. *Cell Signal* 2001;13(12):855–62.
- Ong S. H., Guy G. R., Hadari Y. R. et al. FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 2000;20(3):979–89.
- Ong S. H., Hadari Y. R., Gotoh N. et al. Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(11):6074–9.
- Lin N., Chen S., Pan W. et al. NP603, a novel and potent inhibitor of FGFR1 tyrosine kinase, inhibits hepatic stellate cell proliferation and ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301(2):C469–77.
- Meloche S., Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007;26(22):3227–39.
- Koziczak M., Holbro T., Hynes N. E. Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene* 2004;23(20):3501–8.
- Lee J. G., Kay E. P. PI 3-kinase/Rac1 and ERK1/2 regulate FGF-2-mediated cell proliferation through phosphorylation of p27 at Ser10 by KIS and at Thr187 by Cdc25A/Cdk2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(1):417–26.
- Miyake M., Ishii M., Koyama N. et al. 1-tert-butyl-3-[6-(3,5-dimethoxy-phenyl)-2-(4-diethylamino-butylamino)-pyrido-
- [2,3-d]-pyrimidin-7-yl-urea (PD173074), a selective tyrosine kinase inhibitor of fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR3), inhibits cell proliferation of bladder cancer carrying the FGFR3 gene mutation along with up-regulation of p27/Kip1 and G1/G0 arrest. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;332(3):795–802.
- Pardo O. E., Arcaro A., Salerno G. et al. Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(14):12040–6.
- Goetz R., Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14(3):166–80.
- Balmano K., Cook S. J. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 2009;16(3):368–77.
- Mohammadi M., Honegger A. M., Rotin D. et al. A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol* 1991;11(10):5068–78.
- Hart K. C., Robertson S. C., Kanemitsu M. Y. et al. Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene* 2000;19(29):3309–20.
- Smith T. G., Karlsson M., Lunn J. S. et al. Negative feedback predominates over cross-regulation to control ERK MAPK activity in response to FGF signalling in embryos. *FEBS Lett* 2006;580(17):4242–5.

25. Mason J. M., Morrison D. J., Basson M. A., Licht J. D. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 2006;16(1):45–54.
26. Kovalenko D., Yang X., Nadeau R. J. et al. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem* 2003;278(16):14087–91.
27. Baird A., Böhlen P. Fibroblast growth factors, in *Peptide growth factors and their receptors* I. Springer, 1990. Pp. 369–418.
28. Matthews D. J., Gerritsen M. E. Targeting protein kinases for cancer therapy. John Wiley & Sons, 2011.
29. Федянин М. Ю., Хмелькова Д. Н., Серебрянская Т. С. и др. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях. *Злокачественные опухоли* 2014;(4). <http://www.malignanttumours.org/>. [Fedyanin M. Yu., Khmelkova D. N., Serebriyskaya T. S. et al. Receptors of fibroblast growth factor at malignant tumours.. *Zlokachestvennye opukholi* = *Malignant Tumours* 2014;(4). <http://www.malignanttumours.org/>. (In Russ.)].
30. Byron S. A., Gartside M. G., Wellens C. et al. Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation. *Cancer Res* 2008;68(17):6902–7.
31. Kunii K., Davis L., Gorenstein J. et al. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and ErbB3 signaling for growth and survival. *Cancer Res* 2008;68(7):2340–8.
32. Knights V., Cook S. J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther* 2010;125(1):105–17.
33. Sarker D., Molife R., Evans T. R. et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of TKI258, an oral, multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(7):2075–81.
34. Taylor S. K., Chia S., Dent S. et al. A phase II study of pazopanib in patients with recurrent or metastatic invasive breast carcinoma: a trial of the Princess Margaret Hospital phase II consortium. *Oncologist* 2010;15(8):810–8.
35. Cristofanilli M., Johnston S. R., Manikhas A. et al. A randomized phase II study of lapatinib + pazopanib versus lapatinib in patients with HER2+ inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(2):471–82.
36. Brady J., Corrie P., Chau I. et al. An open-label study of the safety and tolerability of pazopanib in combination with FOLFOX6 or CapeOx in patients with colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2013;31(5):1228–35.
37. Patel R. R., Sengupta S., Kim H. R. et al. Experimental treatment of oestrogen receptor (ER) positive breast cancer with tamoxifen and brivanib alaninate, a VEGFR-2/FGFR-1 kinase inhibitor: a potential clinical application of angiogenesis inhibitors. *Eur J Cancer* 2010;46(9):1537–53.
38. Shiang C. Y., Qi Y., Wang B. et al. Amplification of fibroblast growth factor receptor-1 in breast cancer and the effects of brivanib alaninate. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123(3):747–55.
39. Siu L., Shapiro J. D., Jonker D. J. et al. NCIC Clinical Trials Group and AGITG: Phase III randomized trial of cetuximab (CET) plus either brivanib alaninate (BRIV) or placebo in patients (pts) with metastatic (MET) chemotherapy refractory K-RAS wild-type (WT) colorectal carcinoma (CRC): The NCIC Clinical Trials Group and AGITG CO. 20 trial. *J Clin Oncol* 2012;30(Suppl 4):3504.
40. Dempke W. C., Zippel R. Brivanib, a novel dual VEGF-R2/bFGF-R inhibitor. *Anticancer Res* 2010;30(11):4477–83.
41. Wilson D., Hoff P. M., Schmoll H. et al. Application of adaptive study designs: Phase II and III results from the cediranib (CED) HORIZON (HZ) II and III studies. *J Clin Oncol* 2011;29(suppl):abstr 3633.
42. Raja F., Perren T., Raja F. A. et al. Randomized double-blind phase III trial of cediranib (AZD 2171) in relapsed platinum sensitive ovarian cancer: results of the ICON6 trial. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(8):43.
43. Okamoto I., Kaneda H., Satoh T. et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and biomarker study of BIBF 1120, an oral triple tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2010;9(10):2825–33.
44. Mross K., Stefanic M., Gmehling D. et al. Phase I study of the angiogenesis inhibitor BIBF 1120 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16(1):311–9.
45. du Bois A., Huober J., Stopfer P. et al. A phase I open-label dose-escalation study of oral BIBF 1120 combined with standard paclitaxel and carboplatin in patients with advanced gynecological malignancies. *Ann Oncol* 2010;21(2):370–5.
46. Kropff M., Kienast J., Bisping G. et al. An open-label dose-escalation study of BIBF 1120 in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Anticancer Res* 2009;29(10):4233–8.
47. Lee C., Attard G., Poupard L. et al. A phase I study of BIBF 1120, an orally active triple angiokinase inhibitor (VEGFR, PDGFR, FGFR) in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:3054.
48. Reck M., Kaiser R., Eschbach C. et al. A phase II double-blind study to investigate efficacy and safety of two doses of the triple angiokinase inhibitor BIBF 1120 in patients with relapsed advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2011;22(6):1374–81.
49. Ledermann J. A., Hackshaw A., Kaye S. et al. Randomized phase II placebo-controlled trial of maintenance therapy using the oral triple angiokinase inhibitor BIBF 1120 after chemotherapy for relapsed ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2011;29(28):3798–804.
50. Bouche O., Maindault-Goebel F., Ducreux M. et al. Phase II trial of weekly alternating sequential BIBF 1120 and afatinib for advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2011;31(6):2271–81.
51. Molife R., de Bono J. S., Bell S. et al. A phase II trial to compare BIBF 1120 or BIBW 2992 monotherapy versus a combination of sequential administration of both medications in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC); ASCO Genitourinary Cancers Symposium. Orlando FLA, USA, 2009.
52. Du Bois A., Kristensen G., Ray-Coquard I. et al. AGO-OVAR 12: a randomized placebo-controlled GCI/ENGOT-Intergroup phase III trial of standard frontline chemotherapy +/- nintedanib for advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(8 Suppl):7–8.
53. Reck M., Kaiser R., Mellemegaard A. et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014;15(2):143–55.
54. Konecny G. N., Finkler N., Garcia A. A. et al. Phase 2 study of second-line dovitinib (TKI258) in patients with fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) – mutated or nonmutated advanced and/or metastatic endometrial cancer. *ESMO* 2014. LBA27.
55. Brooks A. N., Kilgour E., Smith P. D. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(7):1855–62.
56. Dey J. H., Bianchi F., Voshol J. et al. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. *Cancer Res* 2010;70(10):4151–62.
57. Koziczak M., Hynes N. E. Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and ErbB2 in regulation of cyclin D1 translation. *J Biol Chem* 2004;279(48):50004–11.
58. Andre F. D. F., Daly F., Azim H. A. et al. FINESSE: An open, three-cohort, phase II trial testing oral administration of lucitanib in patients with FGFR1-amplified or nonamplified estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(5s):abstr TPS1134.
59. Gozgit J. M., Wong M. J., Moran L. et al. Ponatinib (AP24534), a multitargeted pan-FGFR inhibitor with activity in multiple FGFR-amplified or mutated cancer models. *Mol Cancer Ther* 2012;11(3):690–9.
60. Gild M. L., Bullock M., Robinson B. G., Clifton-Bligh R. Multikinase inhibitors: a new option for the treatment of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(10):617–24.
61. Gavine P. R., Mooney L., Kilgour E. et al. AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth

factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res* 2012;72(8):2045–56.

62. Guagnano V., Furet P., Spanka C. et al. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family

of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 2011;54(20):7066–83.

63. Martinez-Torrecuadrada J., Cifuentes G., López-Serra P. et al. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6280–90.

64. Qing J., Du X., Chen Y. et al. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14) – positive multiple myeloma in mice. *J Clin Invest* 2009;119(5):1216–29.

65. Zhang H., Lorianne M., Baker K. et al. FP-1039 (FGFR1: Fc), a soluble FGFR1 receptor antagonist, inhibits tumor growth and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2007;6(11 Suppl):B55.

Новое в изучении множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы

А. А. Ставровская¹, Г. П. Генс²

¹ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²кафедра онкологии и лучевой терапии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

Контакты: Алла Александровна Ставровская astavrovskaya@yahoo.com

Рак молочной железы (РМЖ) — самое распространенное онкологическое заболевание у женщин в России. Одним из основных видов лечения РМЖ является системная химиотерапия. Серьезным препятствием на пути успешного лечения РМЖ остается устойчивость опухолей к лекарственным препаратам, в первую очередь — множественная лекарственная устойчивость (МЛУ). В данном обзоре представлены данные последнего времени о молекулярных механизмах МЛУ, а также о некоторых новых биологических прогностических маркерах РМЖ. Разбираются данные, показывающие, что транспортные белки семейства ABC (ABC-транспортёры) влияют на опухолевую прогрессию не только путем индукции лекарственной устойчивости клеток, но и в связи с их участием в экспрессии признаков малигнизации. Рассмотрены результаты, свидетельствующие об участии ABC-транспортёров в процессах накопления стволовых клеток опухолей под влиянием химиотерапии. Обсуждается проблема участия сигнального пути PI3K/AKT/PTEN в регуляции МЛУ путем его влияния на активность ABC-транспортёров. Рассмотрены данные о влиянии нарушений регуляции микроРНК на МЛУ РМЖ, а также некоторые эпигенетические механизмы регуляции МЛУ. Среди новых прогностических маркеров МЛУ РМЖ обсуждаются серин-треониновая фосфатаза 2A, рецепторная протеинкиназа PTK7, фасцин — белок, способствующий связыванию нитей актина в пучки, многофункциональный белок YB-1. Обсуждаются перспективы исследований МЛУ при РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, прогрессия опухолей, множественная лекарственная устойчивость, биологические маркеры опухоли, транспортные белки семейства ABC, стволовые клетки опухолей

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.039—051

News in the studies of multidrug resistance of breast cancer cells

A. A. Stavrovskaya¹, G. P. Guens²

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia;

²Department of Oncology and Radiology, A. I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; 20 Bldg. 1 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia

Breast cancer (BC) is the most common cancer among women in Russia. One of the main treatment methods of BC is systemic chemotherapy. Multidrug resistance of tumor cells (MDR) is the important hindrance on the way to successful chemotherapy. The new data concerning molecular mechanisms of MDR will be presented in this review. The recent data concerning some new biological prognostic markers will be also discussed. There are data showing that transporters of ABC family (ABC transporters) influence tumor progression not only by MDR induction but also by the influence on the traits of malignancy in tumor cells. The results of the studies of ABC transporters' participation in the processes of accumulation of tumor stem cells under the influence of chemotherapy will be discussed. The problem of the participation of ABC transporters in the phenomenon of influence of PI3K/AKT/PTEN signal transduction pathway on the MDR regulation is discussed. The results of the studies of the role of microRNA deregulation in breast cancer drug resistance as well as studies of some epigenetic mechanisms of MDR regulation will be considered. Protein phosphatase 2A (PP2A, serine/threonine phosphatase), PTK7 (protein tyrosine kinase 7), fascin (an actin bundling cytoskeletal protein) multifunctional YB-1 protein will be considered as new BC prognostic markers. The perspectives of MDR studies will be discussed as well.

Key words: breast cancer, tumor progression, multidrug resistance, biological tumor markers, transporters of ABC family, tumor stem cells

Введение

Устойчивость новообразований к химиотерапии — проблема сложная. Это определяется прежде всего тем, что механизмы, определяющие лекарственную устойчивость опухолевых клеток, множественны и разнообразны. Схематически основные механизмы лекарственной устойчивости представлены на рис. 1.

Лекарственная устойчивость может быть связана с повышенной активностью транспортных белков семейства ABC (ATP-binding cassette), выводящих чужеродные вещества из клеток [1—4]. Такой тип лекарственной резистентности обычно называют множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), так как клетки с повышенной активностью ABC-транспортёров могут



Рис. 1. Механизмы лекарственной устойчивости опухолевых клеток

стать устойчивыми к большому количеству веществ, разных по механизму действия и структуре. Среди этих веществ химиопрепараты, используемые при терапии рака молочной железы (РМЖ), — доксорубицин, даунорубицин, винбластин, паклитаксел [4]. Причиной резистентности к цисплатину может являться пониженное энергозависимое поступление препарата в клетки [5]. Резистентность к химиопрепаратам может быть связана с функционированием систем детоксикации, в частности с системой многоцелевых оксидаз P450 [6], а также с системами репарации ДНК [7]. Важным механизмом лекарственной устойчивости являются нарушения программ гибели клеток, например апоптоза [8]. Нарушения функционирования сигнальных путей клетки, вовлеченных в контроль ее пролиферации и выживания, также могут служить механизмом лекарственной устойчивости [9]. В последние годы появились данные о важной роли микроРНК в прогрессии и лекарственной устойчивости РМЖ [10]. Сочетания разных механизмов лекарственной устойчивости нередко обнаруживаются в клетках РМЖ. Лекарственная устойчивость опухолевых клеток тесно связана с основными признаками злокачественной трансформации [11], что еще раз подчеркивает сложность этой проблемы. В данной статье мы разберем подробнее новые данные, относящиеся к некоторым механизмам лекарственной устойчивости РМЖ, как предсуществующей, так и приобретенной в результате лечения.

Механизмы лекарственной устойчивости

Транспортные белки семейства ABC

Общая характеристика. Один из важных механизмов лекарственной устойчивости — транспортные белки семейства ABC (далее — ABC-транспортёры) [3]. Местом их локализации чаще всего является плазматическая мембрана клетки, через которую ABC-транспортёры перемещают свои субстраты. Этот процесс энергозависим. Активный транспорт субстратов может осуществляться против градиента концентрации

и зависит от гидролиза аденозинтрифосфата [3]. В геноме человека 48 генов кодируют ABC-транспортёры. Их разделяют на 8 подсемейств (ABCA—ABCH). Существует немало обзоров, посвященных этим белкам [1–4 и др.], поэтому здесь мы не будем подробно останавливаться на их общей характеристике. В табл. 1 представлены сведения относительно участия ABC-транспортёров в лекарственной устойчивости РМЖ [12–20], а также перечислены их ингибиторы [16, 21–27]. Как можно видеть, значительное количество разных транспортных белков влияет на чувствительность клеток РМЖ к широкому кругу лекарственных препаратов. Особняком в этом списке стоит транспортёр ABCC12. Его субстраты до сих пор не найдены. Однако этот транспортёр гиперэкспрессирован в опухолях молочной железы [17]. Можно надеяться, что его роль при РМЖ будет выяснена в ближайшее время. Интенсивные исследования показали, что основными ABC-транспортёрами, определяющими МЛУ различных новообразований, являются ABCB1, ABCC1 и ABCG2. Это, несомненно, относится и к РМЖ. Поэтому наибольшее внимание при исследовании МЛУ уделялось и уделяется именно этим белкам.

Ингибиторы ABC-транспортёров. Мы остановимся подробнее на модуляторах МЛУ, обусловленной ABC-транспортёрами. В наших предыдущих обзорах мы не разбирали проблему преодоления МЛУ. Между тем эта область очень важна и интенсивно разрабатывается. Изучение путей преодоления МЛУ, обусловленной активностью ABC-транспортёров, начиналось с работ, направленных на наиболее избирательное подавление транспортной активности этих белков, в первую очередь ABCB1 — Р-гликопротеина (Pgp). Большинство модуляторов были субстратами Pgp или двух других транспортёров (ABCC1, ABCG2) и ингибировали выброс противоопухолевых препаратов в системах *in vitro* и *in vivo* [21].

Около 30 лет назад Т. Tsuruo et al. показали, что блокатор кальциевых каналов верапамил усиливает цитотоксический эффект винкристина и винбластина

Таблица 1. Транспортные белки семейства ABC, определяющие лекарственную устойчивость клеток опухолей молочной железы

Ген (белок)	Препараты, выбрасываемые транспортером	Источник	Ингибиторы активности транспортеров	Источник
<i>ABCB1</i> * (Pgp, MDR1)**	Доксорубин, винбластин, этопозид, таксол	[12, 13]	Верапамил, циклоспорин А, валсподар (PSC833), элакридар (GF120918), ритонавир, хинидин	[21, 22]
<i>ABCC1</i> (MRP1)	Доксорубин, даунорубин, винбластин, колхицин, этопозид, камптотецины, метотрексат	[12–14]	МК571, лейкотриен С4, пробенецид, бензбромарон и др.	[21, 22]
<i>ABCC4</i> (MRP4)	6-Меркаптопурин, 6-тиогуанин, метотрексат	[12–14]	Цифурин 1, цифурин 2 (ceefourin 1, ceefourin 2)	[23]
<i>ABCC5</i> (MRP5)	6-Меркаптопурин, 6-тиогуанин	[12–14]	Пробенецид, треквензин, силденафил	[22, 24]
<i>ABCC10</i> (MRP7)	Таксаны, винкаалкалоиды, Ара-С, гемцитабин	[14–16]	Цефарнитин, иматиниб, нилотиниб, лапатиниб, эрлотиниб, сорафениб, силденафил, варденафил	[16, 25–27]
<i>ABCC11</i> (MRP8)	5-Фторурацил, метотрексат, Ара-С	[14–16]	МК571	[16, 26, 27]
<i>ABCC12</i> (MRP9)	Не известно	[15–17]	Не известно	—
<i>ABCG2</i> (BCRP)	Митоксантрон, топотекан, доксорубин, даунорубин, иринотекан, иматиниб, метотрексат	[18–20]	Фумитреморгин С, gefitinib, иматиниб, элакридар, тариквидар, бирикодар, силимарин, кверцетин, диадзеин	[21, 22]

Примечание. * — названия транспортеров по современной терминологии; ** — названия транспортеров (предыдущие терминологии), часто встречающиеся в литературе.

в клетках мышинового лейкоза, резистентного к винкристину [28]. Затем было обнаружено, что иммуносупрессор циклоспорин А полностью подавляет устойчивость клеток лейкоза человека к винкристину и даунорубину [29]. Эти эффекты были связаны с тем, что модуляторы взаимодействовали с сайтом связывания субстрата Pgp [30, 31]. Эти модуляторы принадлежат к ингибиторам МЛУ первого поколения [21], за ними последовали модуляторы более поздних поколений и клинические испытания ингибиторов. Клинические исследования ингибиторов выявили их высокую токсичность в тех концентрациях, которые ревертировали МЛУ [21]. Главными требованиями при получении модуляторов третьего поколения были отсутствие ингибирования оксидаз P450 и отсутствие влияния на фармакокинетику лекарственных препаратов [32]. В результате широкого поиска был найден модулятор третьего поколения тариквидар (антранилиамид, XR9576), который в последние годы рассматривался как наиболее перспективный ингибитор МЛУ, определяемой активностью Pgp. В экспериментальных системах тариквидар в низких концентрациях потенцировал цитотоксический эффект нескольких противоопухолевых препаратов, включая доксорубин, паклитаксел, этопозид и винкристин [32]. Клинические испытания тариквидара пока не дали выраженных положительных результатов. Исследование влияния тариквидара на химиотерапию антрациклиновыми антибиотиками и таксанами 17 пациенток с РМЖ III–IV стадии не выявило существенного влияния модулятора на результаты терапии [33]. Два исследования (III фаза испытаний) по применению та-

риквидара при химиотерапии немелкоклеточного рака легкого пришлось прервать, так как больные, получавшие тариквидар, страдали от усиления токсического эффекта химиотерапии [32]. Хотя исследователи, занимающиеся клиническими эффектами тариквидара, продолжают работу и сохраняют определенные надежды на этот препарат, очевидно, что ситуация с применением ингибитора ABC-транспортеров третьего поколения достаточно сложная. Сложность эта связана, прежде всего, с физиологическими функциями Pgp в организме. Поскольку Pgp экспрессирован и функционален в эпителии почечных канальцев и в слизистой оболочке кишечника, ингибитор Pgp может влиять на всасываемость лекарств при пероральном приеме и на выделение препаратов через почки. Несмотря на явные неудачи клинических испытаний, эти работы продолжаются. Исследователи надеются, что удастся объективно оценить эффективность и безопасность сочетанной терапии противоопухолевыми препаратами и ингибиторами ABC-транспортеров при изучении влияния ингибиторов на фармакокинетику лекарственных средств [32]. Неудачи в применении ингибиторов ABC-транспортеров в клинике, возможно, связаны также и с тем, что в резистентных клетках может быть экспрессировано несколько (даже много) разных ABC-транспортеров, обладающих разной субстратной специфичностью [34–36].

ABC-транспортеры и признаки злокачественной трансформации. ABC-транспортеры выполняют в клетке не только защитные функции, но могут влиять и на основные признаки злокачественной трансформации [37]. Так, показано, что ABCC1 (MRP1) участвует в ауто-

кринной регуляции пролиферации через стимуляцию выброса из клеток лизофосфолипида лизофосфатидилинозитола, который, связываясь с соответствующим рецептором на поверхности клеток, стимулирует их размножение [38]. ABC-транспортёры выбрасывают из клеток такие биологически активные липиды, как простагландины и лейкотриены, которые способны активировать сигнальные каскады, регулирующие пролиферацию, миграцию, выживаемость клеток [39, 40]. ABCC1 в культивируемых клетках нейробластом человека влиял на их выживаемость: нокдаун ABCC1 потенцировал гибель клеток [41]. Выведение в окружающую опухолевые клетки среду липидов и сигнальных молекул может влиять на экспрессию клетками цитокинов.

Несколько ABC-транспортёров влияют на движение клеток. Так, индуцированная миграция периферических дендритных клеток в лимфоузлы сильно снижена у мышей ABCC1^{−/−} [42]. Если воздействовать на такие дендритные клетки лейкотриеном C₄ (субстратом ABCC1 — MRP1), то их движение нормализуется. Можно полагать, что ABCC1 принимает участие в аутокринной регуляции движения дендритных клеток у мыши. Было показано, что у человека ABCB1 (Pgp) влияет на подвижность нормальных дендритных клеток. Нейтрализующие антитела к Pgp и ингибитор Pgp верапамил подавляли миграцию дендритных клеток [43]. Уменьшение экспрессии гена *ABCB1* в результате воздействия короткой интерферирующей РНК (siРНК) снижало миграцию клеток культуры РМЖ человека MCF-7 [44], клеток меланомы человека [45]. Введение *ABCB1* в клетки почки собаки линии MDCK повышало подвижность этих клеток, увеличивало их миграцию [46]. Таким образом, ABC-транспортёры могут влиять на опухолевую прогрессию не только через увеличение лекарственной устойчивости, но и через усиление злокачественных свойств клеток.

ABC-транспортёры и стволовые клетки опухолей. Роль ABC-транспортёров в эволюции опухолей тесно связана с их экспрессией в стволовых клетках опухолей (СКО). Существование СКО впервые было доказано в 1997 г. для острого лейкоза [47]. Под СКО понимают клетки, способные к самообновлению (способность делиться и существовать, не дифференцируясь при этом). Второй особенностью СКО является то, что часть дочерних клеток может дифференцироваться, образуя специфические для данной ткани элементы [47]. С самого начала проблема СКО оказалась тесно связанной с ABC-транспортёрами: выяснилось, что некоторые из ABC-транспортёров гиперэкспрессированы в нормальных стволовых клетках и в СКО [2, 48]. Это прежде всего ABCG2, ABBI и ABCC1, а также ABCC5 [2, 49]. Появились данные, показывающие, что в нормальных стволовых клетках на определенных этапах их существования экспрессируется значительное число генов, кодирующих ABC-транспортёры [49].

Эти ABC-транспортёры могут не только участвовать в защите стволовых клеток, но и стимулировать их размножение и подвижность. Гиперэкспрессия ABC-транспортёров стволовыми клетками легла в основу одного из методов выделения стволовых клеток — метода боковой популяции [50]. ABCG2 (BCRP) выводит из клеток такие красители, как родамин 123 (Rh123) и Hoechst 33342. Способность к выбросу этих красителей отличает стволовые клетки от дифференцированных, которые после отмывания красителя остаются окрашенными. Боковая популяция, выделенная из культуры клеток РМЖ человека MCF-7, составила 2 % клеток культуры и могла образовывать опухоли при прививке животным [51].

Стволовые клетки опухолей

Для солидных опухолей существование СКО впервые было продемонстрировано на материале РМЖ. Было показано, что в популяциях РМЖ имеется малая фракция с фенотипом CD44^{high}/CD24^{low} [51]. При лечении больных РМЖ лекарственными препаратами может нарастать количество клеток, характеризующихся признаками СКО. Так, обнаружено, что после неоадьювантной химиотерапии в опухолях молочной железы увеличивается количество клеток с фенотипом CD44⁺/CD24[−]. Это происходит достаточно быстро — примерно через 12 нед лечения [52]. При этом повышалась способность клеток РМЖ формировать маммосферы, возрастала степень их опухолеродности при подкожном введении клеток экспериментальным животным [52]. Было показано, что транскрипция генов, характерных для СКО, возрастала при воздействии лекарственных препаратов [52]. В клетках больных РМЖ после неоадьювантной терапии наблюдалось повышение экспрессии транспортёров ABCB3, ABCC7, ABCF2, ABCC5, ABCA12 [53].

Экспрессия ABC-транспортёров может способствовать накоплению СКО под влиянием противоопухолевых препаратов. В работе А. М. Calcagno et al. было показано, что клетки РМЖ человека линии MCF-7, выжившие после длительного воздействия доксорубицина, приобретают лекарственную устойчивость (клетки MCF-7/ADR), в основе которой — гиперэкспрессия ABCB1 [54]. Продолжительная лекарственная селекция способствовала также появлению клеток, имеющих такой же фенотип, как и стволовые клетки РМЖ, — CD44⁺/CD24[−] [54]. Клетки MCF-7/ADR более инвазивны *in vitro* (в камерах Бойдена, покрытых матригелем), чем родительская линия, обладают способностью формировать маммосферы и более опухолеродны при прививке мышам, что характерно для СКО.

При исследовании больных хроническим миелолейкозом нами были обнаружены достоверные различия в выживаемости пациентов в зависимости от наличия или отсутствия выброса Rh123 клетками крови и костного мозга. Хорошо известно, что о функциональной активности Pgp чаще всего судят по скорости

выведения клетками Rh123, являющегося субстратом Pgp. Таким образом, выживаемость больных была связана с наличием в лейкозных клетках функционально активного Pgp. Мы получили также данные, свидетельствующие о том, что при лечении иматинибом происходит накопление стволовых лейкозных клеток, характеризующихся фенотипом CD34+/CD38– и экспрессией Pgp и других ABC-транспортёров [55]. Все эти данные показывают, что разные препараты могут способствовать накоплению СКО в опухолях молочной железы и других новообразованиях.

Изменения в путях передачи сигнала в клетках рака молочной железы

Благодаря применению методов секвенирования нового поколения удалось определить драйверные мутации генов и изменения числа копий генов при РМЖ [56]. Было исследовано около 900 случаев РМЖ всех основных молекулярных подтипов РМЖ (люминальные А и В, базальный, ErbB2, сходный с нормальным) [56–60] и обнаружено много повторяющихся от случая к случаю мутаций. Среди наиболее частых – мутации генов *TP53*, *PIK3CA*, *GATA3*, *PTEN* [56]. Изменения затрагивают два основных пути сигнальной трансдукции – PI3K/AKT и JUN/MAPK [56–60], при этом путь PI3K/AKT обычно активирован, а путь JUN/MAPK – подавлен. Изменения компонентов сигнального каскада PI3K/AKT (*PIK3CA*, *PIK3R1*, *AKTs*, *PTEN*) – взаимоисключающие, т.е. не встречаются в одном образце опухоли. Точно так же взаимоисключающими являются амплификация или гиперэкспрессия рецепторных тирозинкиназ (*IGF1R*, *EGFR*, *ErbB2*) и изменения каскада PI3K/AKT. Это позволяет полагать, что при РМЖ нарушения рецепторных тирозинкиназ прежде всего необходимы для активации пути PI3K/AKT [56]. A. Guille et al. предполагают, что опухоль-ассоциированные генетические изменения приводят к переключению сигналинга в эпителии молочной железы – от активного пути JUN/MAPK к неактивному и от неактивного пути PI3K/AKT к активному [56]. В СКО путь PI3K/AKT может стимулировать их самообновление и/или пролиферацию, а путь JUN/MAPK может определять дифференцировку или остановку клеточного цикла. Клетки опухолей люминального подтипа размножаются медленнее клеток РМЖ других подтипов. Они являются наиболее дифференцированными. В люминальных опухолях чаще встречается амплификация циклина D1. Сочетание изменений циклина D1 и изменений пути PI3K/AKT может определять особенности фенотипа люминальных опухолей. Инактивация *TP53* встречается при всех подтипах РМЖ, но частота этого события повышена при более агрессивных подтипах, особенно при базальном [56].

Есть немало данных, свидетельствующих о том, что повышение или подавление активности сигнального пути PI3K/AKT/PTEN влияет на устойчивость опухолей к химиотерапевтическим препаратам, таким

как винкристин, паклитаксел, доксорубин [61–64]. Использование культивируемых клеток РМЖ показало, что в популяциях клеток, экспрессирующих рецепторы HER-2 и HER-3, отмечается повышенный уровень фосфорилирования AKT (т.е. уровень активированной AKT). При этом возрастает резистентность ко многим химиотерапевтическим препаратам (паклитакселу, доксорубину, 5-фторурацилу, этопозиду, камптотекану) [65]. Таким образом, сигнальный путь PI3K/AKT/PTEN вовлечен в регуляцию не просто лекарственной устойчивости, а МЛУ.

Одним из механизмов влияния сигнального каскада PI3K/AKT/PTEN на МЛУ является регуляция активности ABC-транспортёров отдельными элементами этого каскада. Так, мы показали, что введение экзогенного *PTEN* в клетки карциномы простаты PC3, так же как и обработка этих клеток ингибитором mTOR рапамицином, приводит к ингибированию активности киназ AKT и mTOR и повышает чувствительность клеток к цитостатикам. При этом введение экзогенного *PTEN* приводит к изменению экспрессии генов *MRP1* (*ABCB1*) и *BCRP* (*ABCG2*) [62].

Изменения активности сигнального пути PI3K/AKT/PTEN в результате введения гена *ST6GAL1* (β-галактозидаза α2, 6-сиалилтрансфераза, модулирующая активность фосфоинозитид-3-киназы) приводили к изменению активности Pgp (*ABCB1*) и *MRP1* (*ABCC1*) [66]. Хотя активация сигнального пути PI3K/AKT/PTEN наблюдается в клетках разных новообразований, в опухолях молочной железы эти изменения особенно часты [67]. Активирующие этот путь генетические изменения могут выражаться в амплификации или гиперэкспрессии рецепторных тирозинкиназ HER-2, EGFR или IGF1R. Активирующие мутации в *PIK3CA*, каталитической субъединице PI3K, обнаруживаются в 36 % случаев РМЖ. Особенно часты они в опухолях люминального типа и в опухолях с амплификацией HER-2 (29–45 %) [68]. Встречаются и другие изменения элементов этого каскада, включая PTEN, нарушения которого наиболее характерны для трижды негативных опухолей.

В связи с такими результатами, применение ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) для влияния на лекарственную устойчивость выступает на первый план. К сожалению, большая часть вновь полученных ИТК недостаточно специфичны, т.е. они ингибируют тирозинкиназы недостаточно селективно [21]. Кроме того, некоторые ИТК способны взаимодействовать с ABC-транспортёрами, что может изменять фармакокинетику лекарственных средств, а также приводить к возникновению лекарственной устойчивости. Тем не менее в этой области проводится большая работа, в общих чертах отраженная в табл. 2. Очевидно, что дальнейшие исследования ИТК должны учитывать уже накопленные сведения, особенно в отношении изменений элементов сигнального пути PI3K/AKT/PTEN в опухолях разных биологических подтипов.

Таблица 2. Ингибиторы сигнального пути PI3K/AKT/PTEN (ИТК) (по данным обзора [67])

ИТК	Стадия разработки	Воздействие на элемент сигнального пути	Применение [69]
LY294002, вортманнин	Первая генерация	PI3K	Препараты токсичны <i>in vivo</i>
GDC-0941, XL-147, BKM120, GSK1059615	Следующая генерация	PI3K	Преклинические исследования
GSK690693, A-443654, MK-2206	То же	AKT	Клинические исследования
Рапамицин, RAD001 (эверолимус), CCI-779 (темсиролимус) и AP-23573 (деферолимус); AZD-8055, OSI-027 и др.	То же	mTOR	Клинические исследования

Нарушения регуляции микроРНК

В последнее десятилетие стало ясно, что важную роль в злокачественной трансформации клеток и в опухолевой прогрессии играют нарушения регуляции микроРНК. МикроРНК – это семейство малых одноцепочечных РНК длиной в 21–23 нуклеотида, не кодирующих белки. Они регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. В большинстве случаев микроРНК действуют как репрессоры трансляции за счет связывания с матричной РНК (мРНК) [69]. МикроРНК – большой класс регуляторных РНК, вовлеченных в контроль экспрессии множества клеточных генов [10]. Сегодня известно более 5000 микроРНК у 58 видов, включая микроРНК, кодируемые геномами вирусов (miRBase, Release 10.0; <http://microrna.sanger.ac.uk>). МикроРНК участвуют в регуляции различных процессов в клетках РМЖ [70, 71]. В табл. 3 приведены примеры участия микроРНК в регуляции некоторых генов, опосредующих лекарственную устойчивость. Из этих примеров видно, что микроРНК регулируют гены, вовлеченные в МЛУ, в том числе гены, кодирующие элементы сигнального пути PI3K/AKT/PTEN, или гены ABC-транспортеров. Недавно появилось сообщение, что экспрессия miR-34a может являться фактором прогноза при РМЖ [72]. Разработан новый метод иммуногистохимического окрашивания срезов опухолей и оценки интенсивности окрашивания miR-34a [72]. Исследование трех когорт пациенток, включающих

примерно 1500 человек, показало, что с утратой miR-34a ассоциировано снижение выживаемости. Существенно при этом, что это относилось только к пациенткам, у которых не были поражены регионарные лимфоузлы [72]. Таким образом, в относительно благополучной группе больных РМЖ определение miR-34a позволило выделить группу повышенного риска. Это – первое исследование такого рода, однако качество работы и большое количество исследованных больных позволяют надеяться на подтверждение полученных результатов.

Метаболические ферменты первой фазы детоксикации ксенобиотиков (многоцелевые оксидазы)

Первая фаза детоксикации ксенобиотиков внутри клетки, или фаза окислительного метаболизма, осуществляется преимущественно ферментами семейства цитохрома P450 (CYP) и эпоксидгидролазами. Суперсемейство CYP включает 57 генов. Их классификацию и номенклатуру можно найти на сайте: <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>. Эти ферменты располагаются в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме и катализируют монооксигеназную реакцию, при которой один атом молекулы кислорода взаимодействует с субстратом, а другой восстанавливается до H₂O [73]. Терапевтические препараты метаболизируются микросомальными CYP (в основном фермен-

Таблица 3. Примеры влияния микроРНК на лекарственную устойчивость опухолевых клеток [71]

Активация микроРНК (upregulation)	Мишень микроРНК	Подавление микроРНК (downregulation)	Мишень микроРНК
miR-10a	Н. о.	miR-128	ABCC5 (MRP5)
miR-21	PTEN, PDCD4	miR-137	YB-1 (ABCB1 опосредованно*)
miR-22	PTEN	miR-181a	ABCG2 (BCRP)
miR-222	PTEN	miR-298	ABCB1 (MDR1)
		miR-505	AKT3

Примечание. Н. о. – не определяли; * – через влияние YB-1.

тами семейств CYP3A, 2D6 и 2C), и продукты этих реакций затем выводятся из клетки транспортерами подсемейства ABCC (MRP) [74, 75]. Таким образом, для жизнедеятельности клетки необходимо взаимодействие между двумя системами — системой многоцелевых оксидаз и ABC-транспортерами. Еще одной формой взаимодействия двух защитных систем клетки может быть частичная детоксикация ферментами CYP лекарственного препарата, что приводит к развитию лекарственной устойчивости.

Взаимодействию ферментов CYP, в первую очередь CYP3A4 (он обеспечивает 60–70 % метаболизма лекарств первой фазы), и Pgp (ABCB1) посвящен исчерпывающий обзор [75]. Установлено, что эти две системы защиты клетки тесно связаны как на уровне организма, так и на клеточном уровне. В настоящее время выявляются молекулярные механизмы таких связей. Одна из недавних работ убедительно демонстрирует, что в культивируемых клетках РМЖ линии MCF-7 происходит координированная регуляция экспрессии фермента первой фазы уридин-5-дифосфат глюкоунозилтрансферазы 1A4 (UGT1A4) и транспортеров семейства ABCC (MRP2, MRP7) [76]. В этих клетках координированная регуляция двух защитных систем осуществляется при участии рецептора эстрогенов α (ER α) и сигнального пути c-Myc. Совместная регуляция CYP3A4 и ABCB1 (Pgp) в клетках кишечника, гепатоцитах человека происходит при участии хорошо известного прегнан-Х-рецептора (PXR), который опосредует активацию транскрипции гена *CYP3A* в ответ на лекарственные препараты [77]. Проводится интенсивная работа по получению новых экспериментальных моделей, позволяющих исследовать взаимодействие двух защитных систем клетки.

Многофункциональный опухолевый супрессор p53

Хорошо известно, что инактивация функции белка p53 — наиболее частое молекулярное изменение в злокачественных опухолях. В 50–60 % новообразований человека (более чем 50 различных типов) обнаруживаются мутации гена *p53* [78]. Более 90 % мутаций *p53* представляют собой миссенс-мутации, приводящие к замене одной из аминокислот в молекуле белка на другую. Характерные для опухолевых клеток миссенс-мутации приводят к изменению конформации молекулы белка p53, что в значительной степени затрагивает его активность: происходит потеря или ослабление способности связывать и активировать гены с p53-респонсивными элементами, репрессировать другие специфические гены-мишени, ингибировать репликацию ДНК и стимулировать репарацию ДНК. Мутации *TP53* часто встречаются в опухолях молочной железы — примерно в 30 % всех случаев [79]. Их частота зависит от биологического подтипа опухоли: они обнаружены в 26 % новообразований люминального подтипа А, в 41 % — люминального В, в 50 % опухолей подтипа с амплификацией HER-2 и в 88 % при

трижды негативном (базальноподобном) подтипе [79]. Таким образом, белки-маркеры, определяющие подтип РМЖ, и TP53 тесно связаны, благодаря чему ответ клеток РМЖ на химиотерапию не определяется простой формулой «мутантный *p53* приводит к лекарственной устойчивости». Показано, что при РМЖ с мутантным *p53* наблюдается высокая частота ремиссий в ответ на химиотерапию доксорубицином—циклофосфамидом, в то время как при опухолях с *p53* дикого типа полная ремиссия не наблюдается [79]. Авторы считают, что под влиянием химиотерапии может происходить не апоптоз, а старение клеточной популяции. Кроме того, было показано, что в ER+—опухолях молочной железы ER α подавляет p53-зависимый апоптоз, индуцированный повреждением ДНК [80, 81]. Есть данные, свидетельствующие о том, что ER α может регулировать транскрипцию *p53* [81]. Это, очевидно, относится не только к РМЖ, но и к опухолям яичника [81]. Таким образом, роль TP53 в лекарственной устойчивости РМЖ и опухолей яичника подлежит дальнейшему уточнению и, вероятно, пересмотру.

Новые биологические прогностические маркеры рака молочной железы и лекарственная устойчивость опухолевых клеток

В литературе периодически появляются сообщения об обнаружении и исследовании новых прогностических маркеров РМЖ. Маркеры принадлежат к разным компартментам и к разным путям сигнальной трансдукции клетки и в целом достаточно распространены в опухолях молочной железы [82].

PP2A (protein phosphatase 2A). Выше уже отмечалась важная роль сигнального пути PI3K/АКТ/PTEN в регуляции лекарственной устойчивости РМЖ. В последнее время появились данные, показывающие, что еще один участник этого сигнального каскада может являться маркером РМЖ и влиять на его чувствительность к терапии: оказалось, что частым событием, характеризующим РМЖ, является нарушение регуляции белка PP2A — серин-треониновой фосфатазы 2A [83]. PP2A, так же как фосфатаза PTEN, снижает активность сигнального каскада, основным элементом которого является PI3K [83]. Показано, что регуляция PP2A нарушена почти в 60 % случаев РМЖ базального типа и типа HER-2+, в 52 % опухолей люминального В-подтипа [83]. Нарушения PP2A приводят к повышенной чувствительности клеток к ингибитору PP2A FTY720, который предлагается использовать для лечения таких новообразований [83].

PP2A является опухолевым супрессором (антионкогеном), который приводит к подавлению в клетках целого ряда процессов, ассоциированных с канцерогенезом и опухолевой прогрессией (рис. 2). Недавно было показано, что PPP2R3C (регуляторная субъединица PP2A) связывается с белком МЛУ Pgp и дефосфорилирует его [84]. Нокдаун PPP2R3C приводит к росту экспрессии Pgp на поверхности клеток и к по-

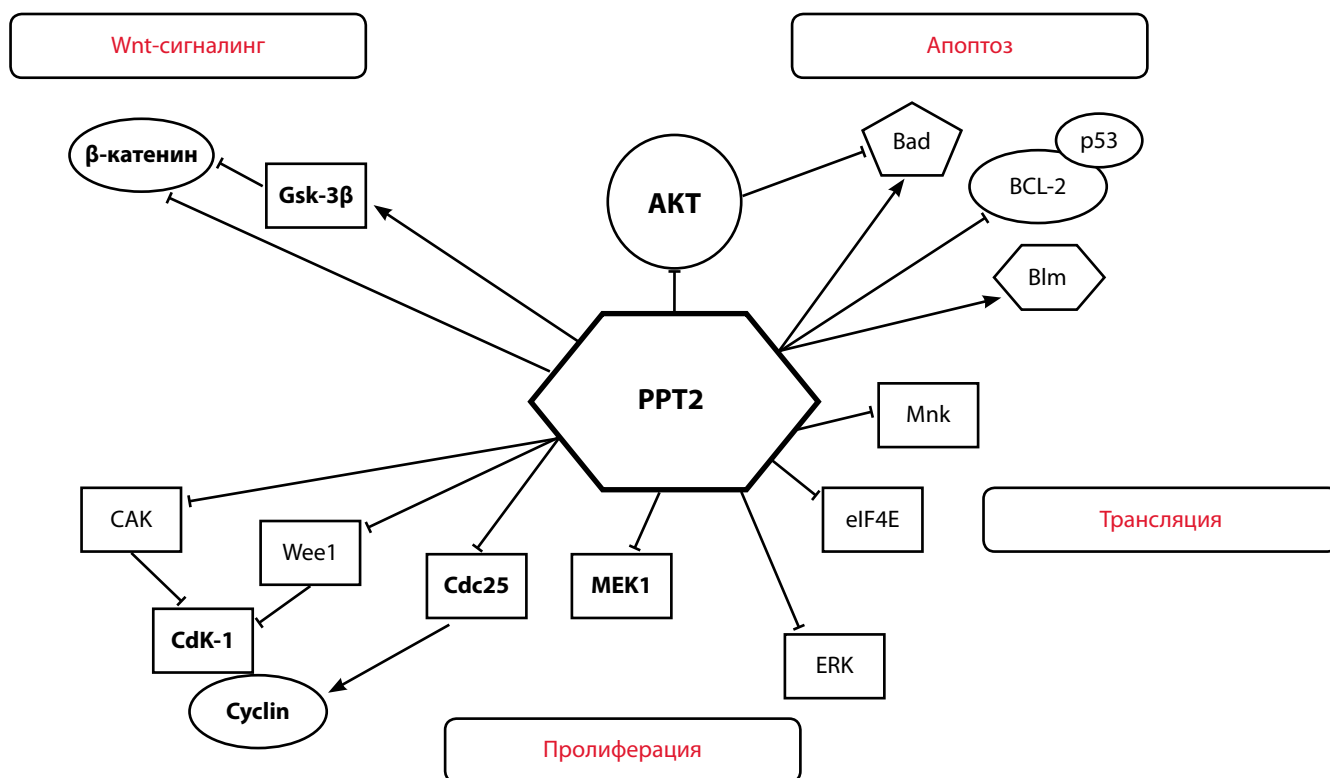


Рис. 2. Влияние фосфатазы PP2A на различные процессы клетки [85]

вышению активности этого транспортера, выводящего из клеток многие вещества. При этом возникает устойчивость клеток к винкристину и доксорубину. Высказано предположение, что с фосфорилированием Pgr связано созревание этого белка и транслокация его внутри клетки [84]. Эти данные — один из немногих примеров прямого участия антионкогена в регуляции экспрессии и активности Pgr. Дальнейшее исследование PP2A при РМЖ представляется перспективным [85].

PTK7 (protein tyrosine kinase 7). Недавно показано, что белок PTK7 может являться маркером РМЖ [86]. PTK7 принадлежит к семейству рецепторных протеинкиназ. Это высококонсервативный белок, участвующий в определении ряда признаков клетки и, в частности, полярности клеток в плоскости клеточного монослоя (planar cell polarity). PTK7 — трансмембранный белок, содержащий 7 иммуноглобулин-подобных петель, трансмембранный домен и каталитический тирозинкиназный домен [86]. Лиганд этого рецептора пока не идентифицирован.

Показано, что PTK7 активно участвует в сигнальном пути Wnt. Хорошо известно, что Wnt-путь регулирует эмбриональное развитие и дифференцировку клеток, и изменения активности Wnt часто ассоциированы с канцерогенезом и опухолевой прогрессией [87]. К рецепторам Wnt относятся трансмембранный белок Фрайзлед (Frizzled, Fz) и липопротеиды низкой плотности LRP5/LRP6, из антагонистов Wnt наиболее известным является PTK7. Различают канонический

(β-катенин-зависимый) и неканонические (β-катенин-независимые) пути воздействия Wnt на клетку. Канонический путь контролирует программы генной экспрессии, связанные с морфогенезом клетки, а неканонические пути регулируют полярность клетки, стимулируя реорганизацию цитоскелета и метаболизм кальция [87]. Было обнаружено, что PTK7 подавляет канонический путь Wnt и стимулирует активность неканонических [88]. Полагают, что PTK7 играет важную роль в миграции опухолевых клеток, их пролиферации, апоптозе, а также в ангиогенезе опухолей [86]. В исследовании [86] на 117 больных РМЖ впервые получены данные, свидетельствующие о том, что при РМЖ наблюдается корреляция между повышенной экспрессией PTK7 и агрессивностью РМЖ, а именно — способностью опухолевых клеток мигрировать из основного опухолевого узла в лимфоузлы, а также давать начало отдаленным метастазам. Сравнение влияния PTK7 на эффективность химиотерапии показало, что больные с повышенной экспрессией PTK7 резистентны к лечению антрациклинами.

Фасцин (Фн) принадлежит к группе белков, которые способствуют организации актинового цитоскелета. Хорошо известно, что цитоскелет играет важнейшую роль во многих биологических процессах и его организация имеет непосредственное отношение к клеточной подвижности, которая определяет процессы инвазии и метастазирования опухолевых клеток [89]. Показано, что повышение экспрессии Фн приводит к активному образованию протрузий мембраны и уве-

личению клеточной подвижности [90]. В норме Фн экспрессирован лишь в некоторых специализированных тканях, но при малигнизации оказывается, что этот белок экспрессируется в различных опухолях, включая опухоли молочной железы [91]. При этом обнаружена корреляция между экспрессией Фн и агрессивностью и метастазированием опухоли [91]. Недавно была выявлена выраженная связь между экспрессией Фн и резистентностью РМЖ к химиотерапии [92]. Было показано, что у больных РМЖ экспрессия Фн в клетках опухолей ассоциирована с более короткой общей и безрецидивной выживаемостью [92]. На модели ксено-трансплантатов у мышей авторы показали, что клетки, экспрессирующие Фн, более резистентны к химиотерапии, чем Фн-отрицательные клетки [92]. Гиперэкспрессия Фн ассоциирована с увеличенной экспрессией PI3K/AKT, IAP и пониженной экспрессией PTEN [92].

YB-1 (Y-бокс-связывающий белок 1). Белок YB-1 является членом суперсемейства белков клеток млекопитающих, обладающих эволюционно консервативным доменом холодового шока и связывающихся с ДНК и РНК. Этот белок участвует в целом ряде клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и ответ на стрессовые воздействия (рис. 3) [93]. Продемонстрирована способность YB-1 усиливать или подавлять транскрипцию различных генов не только самостоятельно, но и через взаимодействие с другими транскрипционными факторами, например YY-1, AP-2, NF- κ B/RelA, DbpA, NF-Y, p53, Snail [94, 95]. YB-1 участвует в сплайсинге мРНК, репликации и репарации ДНК [93, 94] (см. рис. 3). В цитоплазме YB-1, связанный с мРНК, входит в состав рибонуклеопротеиновых частиц. Участие YB-1 в регуляции трансляции зависит от его концентрации в клетке: показано, что низкая концентрация данного белка стимулирует трансляцию, а высокая — подавляет [93, 94]. Под контролем YB-1 находится синтез многих клеточных белков, в том числе белков клеточной защиты, определяющих лекарственную устойчивость опухолей (ABCB1, он же Pgp; MVP/LRP), белков, участвующих в процессах клеточной пролиферации (ци-

клины A и B1, ДНК-полимераза альфа), рецепторов факторов роста (EGFR, HER-2), элементов внеклеточного матрикса (MMP-13, коллагена) и др. [93, 96–98]. Эти данные свидетельствуют о том, что YB-1 участвует в регуляции многих жизненно важных процессов клеток различных типов дифференцировки, являясь потенциальным кандидатом для исследования в качестве предикторного маркера прогрессии различных опухолей.

Проблема использования YB-1 в качестве предикторного маркера опухолей и РМЖ в частности обсуждается достаточно давно [99, 100]. Однако до последнего времени она оставалась нерешенной. Мы проводили систематические исследования данного вопроса [2, 101]. Исследования опухолей, взятых у больных при мастэктомии, показали присутствие YB-1 в ядре опухолевых клеток у 26 % больных и высокую экспрессию мРНК гена *YB-1* у 65 % пациенток; уровень экспрессии мРНК гена *YB-1* и локализация белка YB-1 не коррелировали друг с другом. Ядерная локализация белка YB-1 не ассоциирована с размером опухоли, поражением лимфатических узлов, экспрессией ER и рецепторов прогестерона. Мы показали, что ядерная локализация YB-1 не имеет прогностической значимости для больных РМЖ ($p = 0,34$) [102, 103]. Неоадьювантная химиотерапия способствует перемещению YB-1 в ядра клеток опухоли ($p = 0,04$). Выдвинута гипотеза, что ядерная локализация YB-1 может определять адаптацию опухолевых клеток к неблагоприятным условиям внешней среды, в том числе, вероятно, и к химиотерапии.

Уровень экспрессии другого исследованного нами показателя, содержания мРНК гена *YB-1*, не ассоциирован с размером опухоли, поражением лимфатических узлов, экспрессией ER и рецепторов прогестерона. Между количеством мРНК гена *YB-1* и экспрессией маркера пролиферации клеток Ki-67 обнаружена положительная корреляция ($r = 0,78$; $p = 0,05$). Это свидетельствует в пользу того, что белок YB-1 является позитивным модулятором пролиферации опухолевых клеток. Повышенная экспрессия мРНК гена *YB-1* и его цитоплазматическая локализация в опухолях молочной железы связаны с гиперэкспрессией генов МЛУ (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* и *LRP/MVP*), что подтверждает возможное участие YB-1 в регуляции генов МЛУ. Высокая экспрессия мРНК гена *YB-1* в ткани опухоли молочной железы статистически значимо коррелирует с ранним появлением отдаленных метастазов (относительный риск (ОР) = 0,38; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,15–0,96; $p = 0,03$) и худшей безрецидивной выживаемостью (ОР = 1,08; 95 % ДИ 0,42–2,81; $p = 0,6$) [102, 103]. Эти данные свидетельствуют о том, что высокое содержание мРНК *YB-1* в опухоли может рассматриваться как неблагоприятный прогностический признак при РМЖ. Определение количества мРНК *YB-1* среди больных с малыми опухолями (T1–2) позволяет выделить группу высокого риска

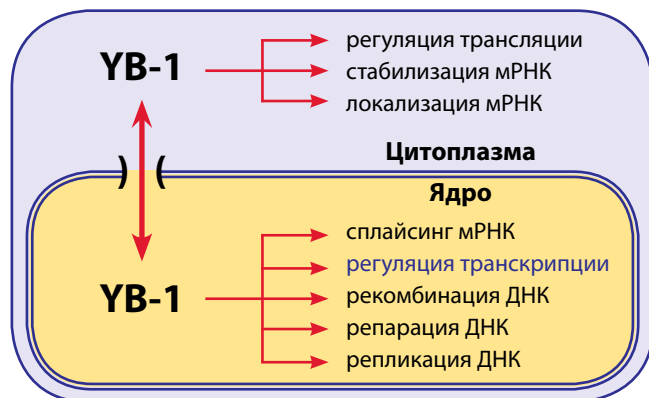


Рис. 3. Функции белка YB-1 в клетке

появления отдаленных метастазов в этой обычно благоприятной группе больных.

TET1 и эпигенетические механизмы регуляции признаков опухолевой клетки. TET1 относится к группе диоксигеназ, катализирующих деметилирование 5-метилцитозина в ДНК, в результате которого 5-метилцитозин окисляется до 5-гидрометилцитозина (5-hmC). Активность всех генов группы *TET* уменьшается в ряде новообразований, включая РМЖ, что коррелирует со снижением количества 5-hmC в опухолях [104]. Предполагается, что 5-hmC можно рассматривать как биологический маркер, снижение количества которого тесно связано с прогрессией опухоли [104]. На культуре клеток РМЖ MCF-7 показано, что ингибитор гистон-деацетилазы повышает экспрессию TET1 и снижает инвазию, а нокдаун TET1 увеличивает инвазию клеток [105]. Таким образом, TET1 выполняет функции антионкогена, подавляя признак малигнизации.

В целом метилирование генов играет значительную роль в прогрессии РМЖ [104]. Обнаружено, что подавление метилирования ДНК ассоциировано с возникновением лекарственной устойчивости клеток РМЖ [106, 107]. Так, исследование 4 маркеров (PITX2, BMP4, FGF4 и C20orf55) показало, что их метилирование позволяет прогнозировать длительность периода до появления отдаленных метастазов у больных с HER-2-негативным РМЖ, получавших антрациклины, и дает возможность выделить группу больных с высокой общей выживаемостью [108]. Оценка степени метилирования промоторов 14 генов показала, что отсутствие метилирования промоторной области гена МЛУ *ABCB1* коррелирует с прогрессированием заболевания в процессе лечения доксорубицином [108]. Сопоставление этих данных с общей выживаемостью больных РМЖ и их ответом на терапию доксорубицином показало, что метилирование *ABCB1* играет важную роль в ответе больных на доксорубицин [109], свидетельствуя об эпигенетической регуляции генов МЛУ при РМЖ.

Заключение

Исследования последнего времени подтвердили представления о том, что МЛУ опухолевых клеток — сложный, многокомпонентный феномен. Интенсивные исследования позволили охарактеризовать некоторые из механизмов МЛУ и продемонстрировали, что разные механизмы МЛУ могут быть взаимосвязаны и сосуществовать в одной клетке. Примеры такого сосуществования приведены выше. Для того чтобы представлять себе набор изменений, определяющих МЛУ данной клеточной популяции, необходимо иметь возможность охарактеризовать геномный ландшафт исследуемого сообщества клеток. Современный уровень методических подходов позволяет это сделать [110]. Это большая, сложная и дорогостоящая работа, однако она поможет выявить драйверные генетические изменения популяций малигнизированных клеток. Кроме того, перспективным на сегодняшний день представляется использование функционального протеомного анализа. Протеомный анализ направлен на одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых характеризует исследуемую популяцию в целом. Среди методов протеомного анализа можно выделить использование белковых чипов с различными типами детекции. Белковые чипы основаны на связывании определенных белков со специфически взаимодействующими или связывающимися с ними молекулами, например специфическими антителами. При функциональном протеомном анализе используются антитела к фосфорилированным и нефосфорилированным формам белков [111]. В целом подобные подходы позволяют выработать новые способы прогноза эффективности терапии, в том числе опухолей молочной железы.

В настоящем обзоре были подробно проанализированы способы преодоления МЛУ, обусловленной активностью ABC-транспортеров, свидетельствующие, что преодоление МЛУ — непростая задача, к сожалению, пока далекая от окончательного решения. Безусловно, эти исследования будут и должны активно развиваться.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток (обзор). Биохимия 2000;65(1):112–26. [Stavrovskaya A. A. Cellular mechanisms of multiple drug resistance of malignant cells (review). Biokhimiya = Biochemistry 2000;65(1):112–26. (In Russ.)].
2. Ставровская А.А., Генс Г.П. Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):5–11. [Stavrovskaya A. A., Guens G. P. Multidrug resistance of tumor cells: some new trends in research. Usp ekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):5–11. (In Russ.)].
3. Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP dependent transporters. Nat Rev Cancer 2002;2(1):48–58.
4. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2009;14(1):3–9.
5. Shen D. W., Goldenberg S., Pastan I., Gottesman M. M. Decreased accumulation of [¹⁴C] carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. J Cell Physiol 2000;183(1):108–16.
6. McDonnell A. M., Dang C. H. Basic review of the cytochrome p450 system. J Adv Pract Oncol 2013;4(4):263–8.
7. Salehan M. R., Morse H. R. DNA damage repair and tolerance: a role in chemotherapeutic drug resistance. Br J Biomed Sci 2013;70(1):31–40.
8. Lowe S. W., Ruley H. E., Jacks T., Housman D. E. p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 1993;74(6):957–67.
9. Davis N. M., Sokolosky M., Stadelman K. et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for

- therapeutic intervention. *Oncotarget* 2014;5(13):4603–50.
10. Mulrane L., McGee S.F., Gallagher W.M., O'Connor D.P. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res* 2013;73(22):6554–62.
 11. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
 12. Szakács G., Paterson J.K., Ludwig J.A. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(3):219–34.
 13. Wind N.S., Holen I. Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. *Int J Breast Cancer* 2011;2011:967419.
 14. Chen Z.S., Tiwari A.K. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J* 2011;278(18):3226–45.
 15. Hopper-Borge E., Chen Z.S., Shchavaleva I. et al. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 2004;64(14):4927–30.
 16. Kruh G.D., Guo Y., Hopper-Borge E. et al. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *PLoS Arch* 2007;453(5):675–84.
 17. Bera T.K., Iavarone C., Kumar V. et al. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(10):6997–7002.
 18. Mao Q., Unadkat J.D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 2005;7(1):E118–33.
 19. Jani M., Ambrus C., Magnan R. et al. Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Arch Toxicol* 2014;88(6):1205–48.
 20. Noguchi K., Katayama K., Sugimoto Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmgenomics Pers Med* 2014;7:53–64.
 21. Shukla S., Ohnuma S., Ambudkar S.V. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Curr Drug Targets* 2011;12(5):621–30.
 22. Sosnik A. Reversal of multidrug resistance by the inhibition of ATP-binding cassette pumps employing “Generally Recognized As Safe” (GRAS) nanopharmaceuticals: A review. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(13–14):1828–51.
 23. Cheung L., Flemming C.L., Watt F. et al. High-throughput screening identifies Ceefourin 1 and Ceefourin 2 as highly selective inhibitors of multidrug resistance protein 4 (MRP4). *Biochem Pharmacol* 2014;91(1):97–108.
 24. Schinkel A.H., Jonker J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(1):3–29.
 25. Kathawala R.J., Wang Y.J., Ashby C.R. Jr, Chen Z.S. Recent advances regarding the role of ABC subfamily C member 10 (ABCC10) in the efflux of antitumor drugs. *Chin J Cancer* 2014;33(5):223–30.
 26. Honorat M., Mesnier A., Vendrell J. et al. ABCC11 expression is regulated by estrogen in MCF7 cells, correlated with estrogen receptor alpha expression in postmenopausal breast tumors and overexpressed in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(1):125–38.
 27. Sodani K., Patel A., Kathawala R.J., Chen Z.S. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* 2012;31(2):58–72.
 28. Tsuruo T., Iida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981;41(5):1967–72.
 29. Slater L.M., Sweet P., Stupecky M., Gupta S. Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. *J Clin Invest* 1986;77(4):1405–8.
 30. Cornwell M.M., Pastan I., Gottesman M.M. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1987;262(5):2166–70.
 31. Goldberg H., Ling V., Wong P.Y., Skorecki K. Reduced cyclosporin accumulation in multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152(2):552–8.
 32. Falasca M., Linton K.J. Investigational ABC transporter inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21(5):657–66.
 33. Pusztai L., Wagner P., Ibrahim N. et al. Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer* 2005;104(4):682–91.
 34. Annereau J.P., Szakács G., Tucker C.J. et al. Analysis of ATP-binding cassette transporter expression in drug-selected cell lines by a microarray dedicated to multidrug resistance. *Mol Pharmacol* 2004;66(6):1397–405.
 35. Szakács G., Annereau J.P., Lababidi S. et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6(2):129–37.
 36. Gillet J.P., Efferth T., Steinbach D. et al. Microarray-based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of ATP-binding cassette transporter genes. *Cancer Res* 2004;64(24):8987–93.
 37. Fletcher J.I., Haber M., Henderson M.J., Norris M.D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 2010;10(2):147–56.
 38. Piñeiro R., Maffucci T., Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 2011;30(2):142–52.
 39. Reid G., Wielinga P., Zelcer N. et al. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(16):9244–9.
 40. Leier I., Jedlitschky G., Buchholz U. et al. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* 1994;269(45):27807–10.
 41. Peaston A.E., Gardaneh M., Franco A.V. et al. MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 2001;85(10):1564–71.
 42. Robbiani D.F., Finch R.A., Jäger D. et al. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC) – dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 2000;103(5):757–68.
 43. Randolph G.J., Beaulieu S., Pope M. et al. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(12):6924–9.
 44. Miletti-González K.E., Chen S., Muthukumaran N. et al. The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res* 2005;65(15):6660–7.
 45. Colone M., Calcabrini A., Toccaceli L. et al. The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion? *J Invest Dermatol* 2008;128(4):957–71.
 46. Barakat S., Turcotte S., Demeule M. et al. Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by P-glycoprotein/caveolin-1 interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372(3):440–6.
 47. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3(7):730–7.
 48. Moitra K., Lou H., Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(4):491–502.
 49. Barbet R., Peiffer I., Hutchins J.R. et al. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle* 2012;11(8):1611–20.
 50. Patrawala L., Calhoun T., Schneider-Broussard R. et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2– cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005;65(4):6207–19.
 51. Al-Haji M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(7):3983–8.
 52. Li X., Lewis M.T., Huang J. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast can-

- cer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(9):672–9.
53. Park S., Shimizu C., Shimoyama T. et al. Gene expression profiling of ATP-binding cassette(ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006;99(1):9–17.
 54. Calcagno A. M., Salcido C. D., Gillet J. et al. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(21):1637–52.
 55. Стромская Т. П., Рыбалкина Е. Ю., Круглов С. С. и др. Участие Р-гликопротеина в эволюции популяций клеток хронического миелолейкоза при воздействии иматиниба. *Биохимия* 2008;73(1):36–46. [Stromskaya T. P., Rybalkina E. Yu., Kruglov S. S. et al. Participation of P-glycoprotein in evolution of chronic myelogenous leukemia cell pool under action of Imatinib. *Biokhimiya = Biochemistry* 2008;73(1):36–46. (In Russ.)].
 56. Guille A., Chaffanet M., Birnbaum D. Signaling pathway switch in breast cancer. *Cancer Cell Int* 2013;13(1):66.
 57. Koboldt D. C., Fulton R. S., McLellan M. D. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490(7418):61–70.
 58. Shah S. P., Roth A., Goya R. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012;486(7403):395–9.
 59. Banerji S., Cibulskis K., Rangel-Escareno K. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012;486(7403):405–9.
 60. Ellis M. J., Ding L., Shen D. et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012;486(7403):353–60.
 61. VanderWeele D. J., Zhou R., Rudin C. M. Akt up-regulation increases resistance to microtubule-directed chemotherapeutic agents through mammalian target of rapamycin. *Mol Cancer Ther* 2004;3(12):1605–13.
 62. Шчербакова Е. А., Стромская Т. П., Рыбалкина Е. Ю., Ставровская А. А. Влияние повышения активности опухолевого супрессора PTEN на чувствительность малигнизированных клеток к химиотерапевтическим препаратам. *Биологические мембраны* 2007;24(2):143–50. [Shcherbakova E. A., Stromskaya T. P., Rybalkina E. Yu., Stavrovskaya A. A. Effect of increase in activity of tumour suppressor PTEN for sensibility of malignant cells to the chemotherapy drugs. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes* 2007;24(2):143–50. (In Russ.)].
 63. Burris H. A. 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71(4):829–42.
 64. McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H. et al. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget* 2012;3(9):954–87.
 65. Knuetfermann C., Lu Y., Liu B. et al. HER-2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2003;22(21):3205–12.
 66. Ma H., Cheng L., Hao K. et al. Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1. *PLoS One* 2014;9(1):e85113.
 67. Cidado J., Park B. H. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012;17(3–4):205–16.
 68. Lauring J., Park B. H., Wolff A. C. The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(6):670–8.
 69. Lee R. C., Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):862–4.
 70. Melo S. A., Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett* 2011;585(13):2087–99.
 71. Martin H. L., Smith L., Tomlinson D. C. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2014;6:1–13.
 72. Agarwal S., Hanna J., Sherman M. E. et al. Quantitative assessment of miR34a as an independent prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer* 2015;112(1):61–8.
 73. Brown C. M., Reisfeld B., Mayeno A. N. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev* 2008;40(1):1–100.
 74. Gillet J. P., Gottesman M. M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol* 2010;596:47–76.
 75. Benet L. Z. The drug transporter-metabolism alliance: uncovering and defining the interplay. *Mol Pharm* 2009;6(6):1631–43.
 76. Edavana V. K., Penney R. B., Yao-Borengasser A. et al. Fulvestrant up regulates UGT1A4 and MRPs through ER α and c-Myb pathways: a possible primary drug disposition mechanism. *Springerplus* 2013;2:620.
 77. Wang Y. M., Lin W., Chai S. C. et al. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P4503A4 and multidrug resistance protein 1. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;272(1):96–107.
 78. Копнин Б. П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. В кн.: *Канцерогенез*. Под ред. Д. Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. С. 125–57. [Kopnin B. P. Tumour suppressors and mutator genes. In: *Carcinogenesis*. D. G. Zaridze (ed.). Moscow: Meditsina, 2004. Pp. 125–57. (In Russ.)].
 79. Bertheau P., Lehmann-Che J., Varna M. et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast* 2013;Suppl 2:S27–9.
 80. Berger C. E., Qian Y., Liu G. et al. p53, a target of estrogen receptor (ER) α , modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. *J Biol Chem* 2012;287(36):30117–27.
 81. Berger C., Qian Y., Chen X. The p53-estrogen receptor loop in cancer. *Curr Mol Med* 2013;13(8):1229–40.
 82. Dos Anjos Pultz B., da Luz F. A., de Faria P. R. et al. Far beyond the usual biomarkers in breast cancer: a review. *J Cancer* 2014;5(7):559–71.
 83. Baldacchino S., Saliba C., Petroni V. et al. Deregulation of the phosphatase, PP2A is a common event in breast cancer, predicting sensitivity to FTY720. *EPMA J* 2014;5(1):3.
 84. Katayama K., Yamaguchi M., Noguchi K., Sugimoto Y. Protein phosphatase complex PP5/PPP2R3C dephosphorylates P-glycoprotein/ABCB1 and down-regulates the expression and function. *Cancer Lett* 2014;345(1):124–31.
 85. Perrotti D., Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol* 2013;14(6):e229–38.
 86. Ataseven B., Gunesch A., Eiermann W. et al. PTK7 as a potential prognostic and predictive marker of response to adjuvant chemotherapy in breast cancer patients, and resistance to anthracycline drugs. *Onco Targets Ther* 2014;7:1723–31.
 87. Yang Y. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci* 2012;2(1):14.
 88. Peradziryi H., Kaplan N. A., Podleschny M. et al. PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J* 2011;30(18):3729–40.
 89. Васильев Ю. М., Гельфанд И. М. Взаимодействие нормальных и неопластических клеток со средой. М.: Наука, 1981. 820 с. [Vasilyev Yu. M., Gelfand I. M. Interaction between normal and neoplastic cells and environment. Moscow: Nauka, 1981. 820 p. (In Russ.)].
 90. Yamashiro S., Yamakita Y., Ono S., Matsumura F. Fascin, an actinbundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 1998;9(5):993–1006.
 91. Yoder B. J., Tso E., Skacel M. et al. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor negative breast cancer and a more aggressive clinical course. *Clin Cancer Res* 2005;11(1):186–92.
 92. Ghebeh H., Al-Khaldi S., Olabi S. et al. Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. *Br J Cancer* 2014;111(8):1552–61.
 93. Елисеева И. А., Ким Е. Р., Гурьянов С. Г. и др. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1)

- и его функции. Успехи биологической химии 2011;51:65–132. [Eliseeva I. A., Kim E. R., Gur'yanov S. G. et al. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2011;51:65–132. (In Russ.)].
94. Скабкин М. А., Скабкина О. В., Овчинников Л. П. Мультифункциональные белки с доменом холодового шока в регуляции экспрессии генов. Успехи биологической химии 2004;44:3–51. [Skabkin M. A., Skabkina O. V., Ovchinnikov L. P. Multifunctional proteins with cold shock domain in regulation of gene expression. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2004;44:3–51. (In Russ.)].
95. Davicioni L. P., Triche T. J. E., Sorensen P. H. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. Cancer Cell 2009;15(5):402–15.
96. Ohga T., Uchiumi T., Makino Y. et al. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. J Biol Chem 1998;273(11):5997–6000.
97. Stein U., Bergmann S., Scheffer G. L. et al. YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. Oncogene 2005;24(22):3606–18.
98. Jurchott K., Bergmann S., Stein U. et al. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. J Biol Chem 2003;278(30):27988–96.
99. Kuwano M., Oda Y., Izumi H. et al. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. Mol Cancer Ther 2004;3(11):1485–92.
100. Matsumoto K., Bay B. H. Significance of the Y-box proteins in human cancers. J Mol Genet Med 2005;1(1):11–7.
101. Генс Г. П., Ставровская А. А. Белок YB-1 как фактор прогноза при раке молочной железы. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН 2010;21(1):3–10. [Guens G. P., Stavrovskaya A. A. Белок YB-1 как фактор прогноза при раке молочной железы. Vestnik RONC im. N. N. Protein YB-1 as forecast factor at breast cancer. Bulletin of N. N. Blokhin NN Blokhin Russian Cancer Research Center at RAMS 2010;21(1):3–10. (In Russ.)].
102. Stavrovskaya A., Stromskaya T., Rybalkina E. et al. YB-1 protein and multidrug resistance of tumor cells. Curr Signal Transduct Ther 2012;7(3):237–46.
103. Guens G. P., Moiseeva N. I., Ovsii O. G. et al. Marker-adjusted personalized chemotherapy of breast cancer. Global J Breast Cancer Res 2014;2:19–26.
104. Yang H., Liu Y., Bai F. et al. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. Oncogene 2013;32(5):663–9.
105. Lu H. G., Zhan W., Yan L. et al. TET1 partially mediates HDAC inhibitor-induced suppression of breast cancer invasion. Mol Med Rep 2014;10(5):2595–600.
106. Kastl L., Brown I., Schofield A. C. Altered DNA methylation is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. Int J Oncol 2010;36(5):1235–41.
107. Jovanovic J., Rønneberg J. A., Tost J., Kristensen V. The epigenetics of breast cancer. Mol Oncol 2010;4(3):242–54.
108. Hartmann O., Spyrtos F., Harbeck N. et al. DNA methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. Clin Cancer Res 2009;15(1):315–23.
109. Dejeux E., Rønneberg J. A., Solvang H. et al. DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. Mol Cancer 2010;9:68.
110. Рыбалкина Е. Ю., Павлова Г. В., Ставровская А. А. Новое в исследовании глиобластом. Биологические мембраны 2014;31(6):1–13. [Rybalkina E. Yu., Pavlova G. V., Stavrovskaya A. A. News of glioblast research. Biologicheskie membrany = Biological Membranes 2014;31(6):1–13. (In Russ.)].
111. Chae Y. K., Gonzalez-Angulo A. M. Implications of functional proteomics in breast cancer. Oncologist 2014;19(4):328–35.

Нейроэндокринные опухоли пищеварительной системы: морфологические и молекулярные особенности

В.В. Делекторская

Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Вера Владимировна Делекторская delektorskaya@yandex.ru

Обзор посвящен анализу современных представлений о нейроэндокринных опухолях (НЭО) пищеварительной системы человека, которые представляют собой гетерогенную группу эпителиальных новообразований, возникающих из клеток диффузной нейроэндокринной системы желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы. Обобщены сведения об особенностях последних гистологических классификаций и критериях морфологической диагностики различных типов нейроэндокринных новообразований с учетом гистологических и иммуногистохимических параметров. В свете этих критериев обсуждаются вопросы номенклатуры, а также системы градации и стадирования. Высокодифференцированные НЭО обычно имеют характерные гистологические признаки в виде гнездных, трабекулярных или железистых структур с низкой митотической активностью и индексом меченая Ki-67 и классифицируются главным образом как G1 или G2. Напротив, низкодифференцированный нейроэндокринный рак имеет диффузный характер роста, высокую степень ядерной атипии и клеточной пролиферации, некрозы. Эти опухоли всегда классифицируются как G3 и далее подразделяются на мелкоклеточный и крупноклеточный типы на основе гистологических особенностей. Иммуногистохимическое исследование является мощным инструментом для подтверждения нейроэндокринной дифференцировки опухолевых клеток с учетом экспрессии хромогранина А и/или синаптофизина. Степень злокачественности (Grade, G) основана на пролиферативной активности опухоли, которая оценивается по количеству митозов или иммуногистохимической экспрессии Ki-67. Обсуждены также отдельные маркеры, которые полезны для определения первичного органа НЭО при анализе метастатических поражений. НЭО являются сложными новообразованиями с точки зрения клинического ведения и оценки прогноза. Только морфологическая картина и иммунофенотипические особенности не имеют предсказательной значимости. Доказано, что Ki-67 является единственным значимым прогностическим маркером и может предсказать эффективность терапии. В обзоре, кроме того, представлены данные о ключевых сигнальных путях и молекулярных маркерах, вовлеченных в развитие нейроэндокринных новообразований желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы. Новые возможности молекулярно-направленной терапии стали доступны для больных НЭО. Рецепторы соматостатина (SSTR) демонстрируют экспрессию и высокое сродство к аналогам соматостатина в этих опухолях. Положительное иммуногистохимическое окрашивание, особенно выявление подтипа SSTR 2A, как было показано, ассоциировано с хорошим терапевтическим ответом на лечение аналогами соматостатина. Выявление экспрессии SSTR помогает предсказать не только эффективность лечения, но и прогноз течения НЭО. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR играет важную роль в развитии НЭО и является мишенью для специфических ингибиторов. Однако конкретные молекулы, которые могут помочь предсказать ответ на лечение, а также уровни их экспрессии и прогностическое значение еще предстоит определить. Выявление специфических прогностических и предиктивных молекулярных маркеров в НЭО может значительно улучшить биологическую и морфологическую характеристику индивидуальных нейроэндокринных новообразований и выбор пациентов для таргетной терапии.

Ключевые слова: нейроэндокринная опухоль, желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа, классификация, морфологическая диагностика, дифференцировка, степень злокачественности, прогноз, иммуногистохимия, молекулярные маркеры

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.052–060

Neuroendocrine tumors of the digestive system: pathologic and molecular characteristics

V. V. Delektorskaya

Scientific Research Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia

This review deals with the analysis of up-to-date concepts of the human neuroendocrine tumors (NETs) of the digestive system, which are a heterogeneous group of epithelial neoplasms arising from the diffuse neuroendocrine system of the gastrointestinal tract and pancreas. The review summarizes the information about the specifics of the recent histological classifications and criteria of diagnosis the different types of neuroendocrine neoplasms accounting histological and immunohistochemical parameters. In the light of these criteria, current issues of the nomenclature, as well as systems of grading and staging are discussed. Well-differentiated NETs generally present characteristic histopathological features with nests, trabecular or gland-like formations, low mitotic activity and Ki-67 labeling indices and are mostly classified as either G1 or G2 NET. In contrast, poorly differentiated neuroendocrine carcinomas have diffuse growth pattern, high-grade nuclear atypia and cellular proliferation, necrosis. They are always classified as G3 and further subclassified into small-cell or large-cell types based on their histological features. Immunohistochemistry is a powerful tool in confirming neuroendocrine differentiation of tumor cells by the expression of chromogranin A and/or synaptophysin. The grade (G) is based on the proliferative activity of the tumor assessed by the mitotic rate or by Ki-67 immunohistochemistry. Several markers are useful in the identification of a primary organ of NETs in metastatic lesions are

also discussed. NETs represent challenging neoplasms in terms of clinical management and prognosis assessment. Morphology alone and immunophenotypic features have no specific predictive implications. Ki-67 has been proven the only significant prognostic marker and can predict response to therapy. Additionally, data on key signaling pathways and potential predictive molecular markers involved in the development of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas are presented in this review. New molecular targeted therapies have become available in patients with NETs. Somatostatin receptors (SSTRs) are expressed by these tumors and show high affinity for somatostatin analogues. Immunohistochemical positive staining, especially of the subtype SSTR 2A, has been shown to be well associated with therapeutic response to somatostatin analogue therapy. Detecting the expression of SSTRs helps to predict not only the efficacy of treatment but also the prognosis in NETs. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway plays a crucial role in development of neuroendocrine neoplasms and is targeted by specific inhibitors. However, the exact cellular molecules, which may help predict response, their expression levels and prognostic values are still to be defined. Determining specific prognostic and predictive molecular markers in NETs can significantly improve biological and morphological characterization of individual neuroendocrine neoplasms and identification of patients that may benefit from targeted therapy.

Key words: neuroendocrine tumor, gastrointestinal tract, pancreas, classification, morphological diagnosis, differentiation, grade, prognosis, immunohistochemistry, molecular markers

Введение

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) объединяют группу относительно редких эпителиальных новообразований из клеток с нейроэндокринным фенотипом [1]. Нейроэндокринные клетки содержатся в значительном количестве в органах пищеварения и являются частью общей диффузной нейроэндокринной системы. НЭО пищеварительной системы могут возникать в любом из органов тубулярного желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и поджелудочной железе (ПЖ) и представляют собой наиболее распространенную группу новообразований, составляющую более 60 % нейроэндокринных неоплазий (НЭН) всех анатомических локализаций. Эти опухоли обладают общей способностью синтезировать биологически активные вещества и пептидные гормоны и в зависимости от уровня гормональной активности и клинической симптоматики делятся на функционирующие и нефункционирующие новообразования [2–4]. Несмотря на то, что НЭО пищеварительной системы относятся к редким опухолям, доля которых составляет не более 2 % среди всех новообразований данной локализации, частота их выявления и распространенность постоянно увеличиваются на протяжении нескольких последних десятилетий [5].

С того момента, как в 1907 г. S. Oberndorfer [6] ввел термин «карциноид», который долгое время рассматривали в контексте опухолей «доброкачественного поведения», представления о природе нейроэндокринных новообразований, особенностях их развития и течения неоднократно менялись, являясь предметом многочисленных дискуссий [2, 7–11].

Важное место в ряду методов, которые помогли дать более глубокую оценку особенностям биологии различных вариантов НЭО, заняла электронная микроскопия, с помощью которой было показано присутствие в цитоплазме нейроэндокринных клеток различного количества электронно-плотных гранул и мелких везикул, ассоциированных с целым рядом секреторных продуктов и нейротрансмиттеров [12, 13].

Расширить общепринятые взгляды на природу НЭО позволило использование достижений современных

иммуногистохимических (ИГХ) и молекулярно-биологических исследований, благодаря которым произошла значительная эволюция в подходах к номенклатуре и оценке злокачественного потенциала новообразований данного типа [14–16].

Несмотря на сходные гистологические, ИГХ- и ультраструктурные особенности, нейроэндокринные новообразования ЖКТ и ПЖ образуют крайне разнородную группу в отношении «биологического поведения» и клинических проявлений [3, 17, 18].

Рациональный подход к номенклатуре НЭО пищеварительной системы обеспечила классификация Всемирной организации здравоохранения (World Health Organization, WHO), опубликованная в 2000 г., в которой впервые была представлена обоснованная терминология и прогностическая стратификация данного типа неоплазий [19]. Учитывая, что общепризнанный термин «карциноид» не мог в полной мере охватить весь спектр нейроэндокринных новообразований ЖКТ и ПЖ, классификация WHO 2000 г. заменила его более общими терминами «эндокринная опухоль» и «эндокринный рак». Предложена единая схема классификации, выделяющая 3 основные категории опухолей независимо от места их развития. Кроме того, для оценки дифференцировки опухоли были введены две основные категории, разделяющие высоко- и низкодифференцированные новообразования, которые значительно различаются по своему клиническому течению [20, 21]. Данная классификация разработала критерии для практического использования. Однако ее применение было ограничено необходимостью встраивать информацию, относящуюся к стадированию, в систему определения степени злокачественности (Grade, G) опухоли.

В дальнейшем Европейское общество по изучению НЭО (European Neuroendocrine Tumor Society, ENETS) разработало две дополняющие друг друга классификации: систему определения степени злокачественности НЭО ЖКТ и ПЖ (ENETS, 2006, 2007), а также дополнительную систему TNM-стадирования по локализации [22]. Другой вариант TNM-классификации

НЭО ЖКТ и ПЖ был предложен Американским объединенным комитетом по онкологии (American Joint Committee on Cancer, AJCC) и включен в 7-ю редакцию Руководства по определению стадий злокачественных опухолей (AJCC, 2009) [23, 24].

Эта концепция основана на том, что клиническое поведение нейроэндокринных новообразований, главным образом, определяют биологические характеристики и стадия на момент диагностики [25]. Длительное клиническое наблюдение свидетельствует, что НЭО являются злокачественной категорией. Так же как для других эпителиальных опухолей, системы гистологической градации и стадирования определяют злокачественный потенциал НЭО и классифицируют их с учетом этих показателей, достоверно коррелирующих с выживаемостью данной категории больных.

Таким образом, согласно современным представлениям, все нейроэндокринные новообразования обладают потенциалом злокачественности, при этом их клиническое течение может варьировать от индолентного до высокоагрессивного, сопровождающегося быстрым развитием метастазов и рецидивов заболевания. Для точной диагностики, оценки прогноза и выбора адекватной терапии НЭО необходимы четкие базовые установки для их классификации в процессе морфологического исследования, а также внедрение новых молекулярных маркеров оценки индивидуального прогноза и мишеней для таргетной противоопухолевой терапии заболевания.

Современная номенклатура и гистологическая классификация

Для практического использования в процессе морфологической диагностики НЭО пищеварительной системы в настоящее время применяется классификация WHO, разработанная в 2010 г., в которую вошли установленные ранее критерии определения степени злокачественности (ENETS, 2006, 2007) и TNM-стадирования (AJCC, 2009) [26].

Для характеристики широкого морфологического и биологического спектра НЭН ЖКТ и ПЖ последняя редакция классификации использует стандартные определения «нейроэндокринная опухоль» и «нейроэндокринный рак». Все высококодифференцированные новообразования, независимо от того, ведут ли они себя «доброкачественно» или дают метастазы, называются термином «нейроэндокринная опухоль» (neuroendocrine tumor, NET) и имеют низкую или промежуточную степень злокачественности (G1 или G2 соответственно). Все низкодифференцированные новообразования называются термином «нейроэндокринный рак» или «нейроэндокринная карцинома» (neuroendocrine carcinoma, NEC) и имеют высокую степень злокачественности, соответствующую градации G3. В соответствии с классификацией WHO 2010 г. для обозначения всей группы нейроэндокринных новообразований ЖКТ и ПЖ предложен термин «ней-

роэндокринные неоплазии» (neuroendocrine neoplasm, NEN), который объединяет опухоли и карциномы всех степеней злокачественности (низкой, промежуточной, высокой). Термин «нейроэндокринные» отражает способность опухолевых клеток экспрессировать белковые маркеры, общие для нервной и эндокринной систем. Термин «карциноид», который был ранее отменен и употреблялся только в контексте карциноидного синдрома, в новой классификации применяется в отношении всех высококодифференцированных НЭО ЖКТ, имеющих низкую степень злокачественности (NET G1) [26–28]. В табл. 1 представлена современная номенклатура, применяемая к различным типам нейроэндокринных новообразований пищеварительной системы (WHO, 2010).

Таблица 1. Классификации НЭН пищеварительной системы (WHO, 2010)

НЭО G1/NET G1 (карциноид)
НЭО G2/NET G2
Нейроэндокринный рак (НЭР), G3 (НЭР G3/NEC G3): мелкоклеточный тип крупноклеточный тип

Морфологические особенности. При оценке гистологического строения НЭН пищеварительной системы важным является выявление признаков нейроэндокринной морфологии и разграничение двух основных групп: высоко- и низкодифференцированных новообразований.

Высокодифференцированные НЭО (G1 и G2) демонстрируют типичную, хорошо организованную гистологическую структуру: органоидную, трабекулярную, альвеолярную или инсулярную модели строения с тонкой фиброваскулярной стромой, разграничивающей гнезда опухолевых клеток, которые иногда формируют цепочки, структуры типа периферических «палисадов» и «розеток». Опухоль построена однотипными клетками округлой или овальной формы с эозинофильной, умеренно развитой цитоплазмой и круглыми ядрами с незаметными ядрышками и характерным гранулярным хроматином типа salt & pepper (рис. 1а). Эти опухоли могут демонстрировать целый спектр вариантов гистологического строения, включая веретенчатый, папиллярный, онкоцитарный, светлоклеточный, муцинсекретирующий, пигментный, с образованием в строме хряща, кости, гиалина, амилоида и другими вариантами дифференцировки.

Категория низкодифференцированного НЭР (G3) включает новообразования, которые классифицируют как мелко- и крупноклеточные типы. НЭР мелкоклеточного типа состоит из мелких однотипных клеток округлой, овальной или вытянутой формы со скудной цитоплазмой и нечеткими клеточными границами. Ключевым диагностическим признаком является вид ядер, содержащих характерный нежный хроматин и незаметные ядрышки. Для опухоли характерны об-

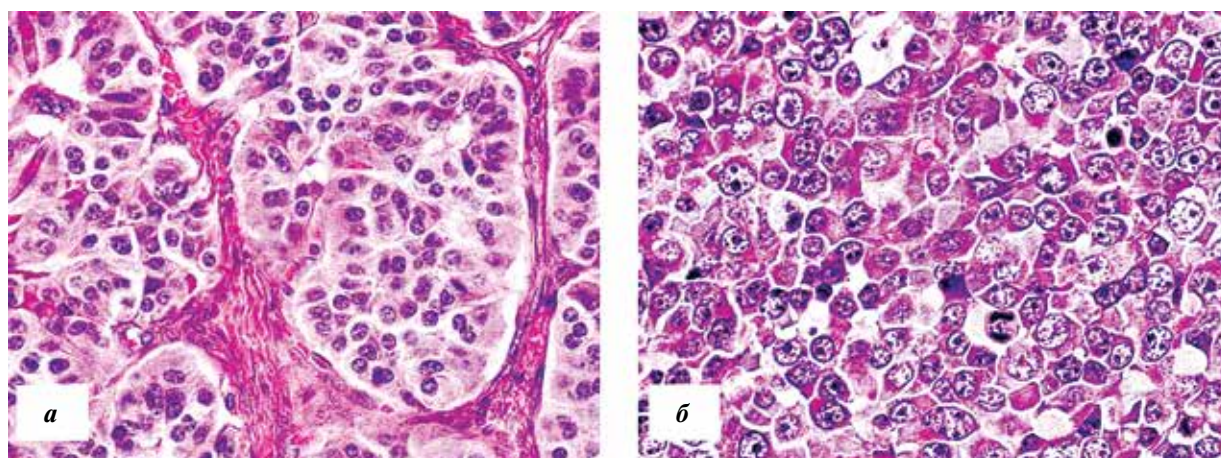


Рис. 1. НЭН различных отделов пищеварительной системы: а — НЭО ПЖ, высокодифференцированная опухоль построена однотипными клетками с характерными округлыми ядрами, содержащими гранулярный хроматин ($\times 600$); б — НЭР толстой кишки крупноклеточного типа, ядра клеток содержат отчетливые ядрышки, видны фигуры митозов ($\times 600$). Окраска гематоксилином и эозином

ширные зоны некроза и высокая митотическая активность. Морфологический диагноз базируется преимущественно на оценке гистологических особенностей опухоли. НЭР крупноклеточного типа построен из клеток крупного/промежуточного размера с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, значительной ядерной атипией, при этом опухоль может сохранять нейроэндокринную морфологию, содержит мультифокальные некрозы, большое число митозов и ядра с гранулярным хроматином и отчетливыми ядрышками (рис. 1б). Для подтверждения диагноза, как правило, необходимо ИГХ- или электронно-микроскопическое исследование [29, 30].

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 подчеркнуть, что место развития определяет различные типы НЭО, которые имеют разный прогноз течения заболевания в зависимости от конкретной первичной локализации новообразования [31–33].

НЭО пищеварительной системы различаются по функциональной активности и спектру продуцируемых гормонов; кроме того, они могут быть одним из проявлений наследственного синдрома множественной эндокринной неоплазии (MEN-1). Функционирующие НЭО наиболее часто наблюдаются в ПЖ, при этом чаще всего встречаются такие типы, как инсулинома и гастринома, а к редким разновидностям относятся вилома, глюкагонома, соматостатинома, опухоль из РР-клеток. Эти опухоли сопровождаются развитием гормональных синдромов, что облегчает их диагностику. Нефункциональные опухоли обычно обнаруживаются на более поздних стадиях заболевания и нередко имеют метастазы на момент диагностики [34–37].

Степень злокачественности. Определение биологического потенциала злокачественности НЭО считается наиболее сложной диагностической проблемой. В соответствии с современными представлениями, отраженными в классификациях WHO/ENETS/AJCC (2010) [22, 26], различная степень злокачественности этих опухолей (G1, G2, G3) основана на оценке гистологии и определении пролиферирующей фракции (уровня митотической активности и индекса Ki-67) (табл. 2).

Ключевым моментом является подсчет количества митозов в 50 полях зрения при большом увеличении микроскопа ($\times 400$) (high power fields, HPF) и ИГХ-определение индекса Ki-67 (клон MIB-1) как процента окрашенных ядер при учете 2000 опухолевых клеток в областях наибольшей пролиферативной активности. Результат выражается как среднее число митозов в 10 HPF (или 2 мм^2) и средний процент окрашенных ядер опухолевых клеток (индекс Ki-67) (см. табл. 2) [38–40].

Таблица 2. Система определения степени злокачественности (WHO/ENETS/AJCC)

Grade	Количество митозов в 10 HPF (2 мм^2)	Индекс Ki-67 (%)
G1	< 2	≤ 2
G2	2–20	3–20
G3	> 20	> 20

Определение пролиферативной активности опухолевых клеток с помощью подсчета индекса Ki-67 является необходимым условием современной морфологической диагностики и служит базой для дальнейшей клинической оценки агрессивности течения заболевания и обоснованного назначения соответствующих режимов лекарственного лечения. Данный показатель достоверно коррелирует с выживаемостью

больных НЭО и является ключевым при выборе вариантов био- и химиотерапии [41–43].

Стадия заболевания. Для того чтобы далее стратифицировать НЭО пищеварительной системы в отношении прогноза их течения, новообразования классифицируются в соответствии с системами pTNM-стадирования, которые были разработаны ENETS (2006, 2007) и AJCC/UICC (2009) [22–24, 26]. Системы TNM-стадирования ENETS и AJCC/UICC (7-я редакция, 2009) используют общепринятые показатели и совпадают для большинства отделов ЖКТ, но имеют существенные отличия для НЭО ПЖ и аппендикса. Дополнительными критериями оценки прогноза являются данные о наличии инвазии кровеносных и лимфатических сосудов, нейроинвазии, участков некроза.

Таким образом, современная морфологическая диагностика широкого спектра НЭН пищеварительной системы базируется на трех обязательных этапах, которые обеспечивают взаимодополняющую информацию и включают определение гистологической дифференцировки, степени злокачественности и стадии заболевания [28, 38].

Клеточный иммунофенотип и молекулярные особенности

В настоящее время морфологическая диагностика НЭН любого отдела пищеварительной системы невозможна без выполнения ИГХ-анализа, который позволяет подтвердить эпителиальную и нейроэндокринную природу опухоли, различить отдельные подтипы НЭО, уточнить гормональный статус, а также определить место развития первичной опухоли при исследовании метастазов без выявленного первичного очага [44–46].

Диагностические маркеры. Для подтверждения нейроэндокринной природы опухоли рекомендованы два основных маркера: **хромогранин А** — один из наиболее характерных неспецифических маркеров, связанный с плотными секреторными гранулами, и **синаптофи-**

зин — маркер мелких везикул. Важно отметить, что экспрессия хромогранина А может варьировать или отсутствовать в низкодифференцированных формах, при этом наличие синаптофизина обязательно для постановки диагноза НЭН (рис. 2а).

Мембранный рецептор молекул нейрорадгезии CD56 (NCAM), а также маркеры цитоплазматических протеинов нейронспецифическая энолаза и PGP9.5 обладают высокой чувствительностью, но не являются достаточно специфичными и не рекомендованы для рутинного использования в диагностике НЭО. Важно отметить, что CD56 рассматривается как наиболее чувствительный маркер для мелкоклеточного типа НЭР, однако, учитывая его низкую специфичность, интерпретировать ИГХ-данные всегда следует в контексте соответствующей морфологической структуры опухоли [46].

Гормоны, определяющие специфический тип секреции клеток опухоли, в отличие от хромогранина А и синаптофизина не относятся к факторам, которые нужно обязательно выявлять при ИГХ-исследовании нейроэндокринных новообразований, так как нефункционирующие НЭО пищеварительной системы, несмотря на отсутствие клинических симптомов гормональной гиперсекреции, могут демонстрировать ИГХ-позитивность к различным гормонам [46].

Для подтверждения эпителиальной природы НЭО используют ИГХ-окрашивание на кератины. Большинство НЭН демонстрируют положительную экспрессию при окрашивании антителами к панцитокератину (AE1/AE3) и антителами к низкомолекулярным цитокератинам (CK8, CK18, CAM 5.2) [44].

При исследовании метастазов высокодифференцированных НЭО без выявленного первичного очага с диагностической целью рекомендованы два основных ИГХ-маркера: CDX2 и TTF1 [47–50]. С помощью данных транскрипционных факторов можно различить наиболее частые первоисточники метастатических опухолей, а именно ЖКТ, ПЖ и легкое [51, 52].

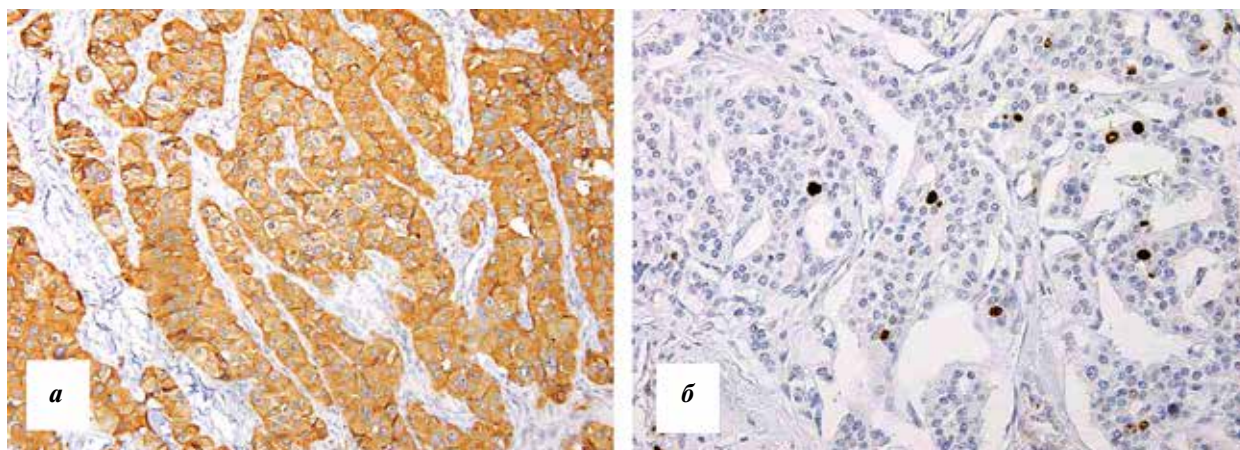


Рис. 2. ИГХ-исследование НЭО ПЖ: а — диффузная цитоплазматическая экспрессия синаптофизина в клетках опухоли ($\times 400$); б — индекс Ki-67 в клетках НЭО G1 составляет 2,5 % окрашенных ядер ($\times 400$). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

В ряде последних работ представлены диагностические маркеры, которые дают возможность дифференцировать первичные опухоли органов ЖКТ и ПЖ: ISL1, PDX1, PAX6 и NESP55 [53, 54]. ИГХ-верификация отдельных специфических пептидных гормонов также может оказаться полезной для определения первичной локализации опухоли.

Пролиферативная активность. Индекс пролиферативной активности клеток Ki-67 (клон MIB-1), как указывалось выше, относится к числу параметров, которые утверждены международными организациями для определения степени злокачественности НЭО пищеварительной системы (WHO, 2010) [55–59]. Следует отметить, что индекс пролиферативной активности опухолевых клеток значительно различается не только между высоко- и низкодифференцированными новообразованиями, но и в пределах групп G2 и G3. Существенные различия в прогнозе и лечебных подходах к НЭН пищеварительной системы различной степени злокачественности и локализации требуют не только более точного и дифференцированного подхода, но и выбора новых пороговых значений для градации этих опухолей, разработка которых активно проводится в настоящее время (рис. 2б).

Таким образом, оптимальная панель ИГХ-окрасок для диагностики высокодифференцированных НЭО включает хромогранин А, синаптофизин и Ki-67 (MIB-1), в то время как диагностика низкодифференцированных вариантов часто требует более широкой панели маркеров, в которую входят окраски с помощью антител к кератинам, хромогранину А, синаптофизину, CD56, CDX-2, TTF-1, ISL1, PDX1 и Ki-67 (MIB-1).

Молекулярные особенности. ИГХ-анализ белковых маркеров в настоящее время открывает широкие возможности не только для точной диагностики НЭО ЖКТ и ПЖ, но и для изучения молекулярных особенностей данных новообразований, которые лежат в основе индивидуального подхода к оценке прогноза заболевания и возможностей лекарственной терапии на основе препаратов направленного действия [60–62].

К числу перспективных маркеров, которые являются предметом современных исследований, направленных на выявление клинически значимых прогностических и предиктивных факторов, относятся рецепторы соматостатина (somatostatin receptor, SSTR) и молекулы путей сигнальной трансдукции PI3K/АКТ/mTOR. В отдельных работах предпринимаются попытки изучить роль определения в опухоли экспрессии таких маркеров, как 6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT), p53, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецепторы VEGFR1–3, инсулиноподобный фактор роста (IGF), рецепторы тирозинкиназы (c-Kit, EGFR) и ряд других белков [63–67]. Проводятся также молекулярно-генетические исследования, направленные на поиск амплификаций, транслокаций, делеций, изменений экспрессии и мутаций соот-

ветствующих генов в клетках НЭО ЖКТ и ПЖ, которые, однако, пока не открыли возможностей использования генетических маркеров в диагностике sporadических случаев развития данных новообразований.

SSTR. Активное изучение экспрессии SSTR в нейроэндокринных новообразованиях пищеварительной системы связано с широким применением в клинической практике синтетических аналогов соматостатина для диагностических целей и молекулярно-направленного лечения [67–70]. SSTR, которые являются специфическими мишенями для этих препаратов, вовлечены в регуляцию целого ряда важных функций в опухолевой клетке, включая подавление гормональной секреции, пролиферации и ангиогенеза. В настоящее время описано 5 подтипов SSTR, которые принадлежат к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками. Показано, что аналоги соматостатина обладают наибольшей специфичностью связывания с рецепторами 2-го подтипа [71–73]. Поскольку показатели экспрессии рецепторов значительно отличаются в разных опухолях, ИГХ-особенности их выявления являются ключевыми параметрами, позволяющими назначить обоснованную лекарственную терапию аналогами соматостатина и, кроме того, оценить прогноз течения заболевания. Выраженный антипролиферативный эффект этих препаратов может быть использован в лечении НЭО различной степени злокачественности [69, 70]. Незначительное количество литературных данных по этой проблеме связано с отсутствием до недавнего времени достаточно специфичных коммерческих антител к SSTR. На сегодняшний день разработаны высокоспецифичные кроличьи моноклональные антитела к SSTR2A (клон UMB-1), а также четкая система оценки их ИГХ-экспрессии, которая достоверно демонстрирует, что только мембранный тип и высокий уровень экспрессии SSTR2A коррелируют с ответом на лечение аналогами соматостатина [72, 73].

Таким образом, уровень ИГХ-экспрессии SSTR2 в хирургических и биопсийных образцах НЭО ПЖ и ЖКТ является важным молекулярным параметром для предсказания эффективности лечения и потенциальным прогностическим маркером, который можно оценивать в процессе морфологической диагностики данных новообразований (рис. 3а).

mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина у млекопитающих). Активация пути сигнальной трансдукции PI3K/АКТ/mTOR является ключевым событием, ассоциированным с ростом и пролиферацией клеток ряда опухолей человека. Белок mTOR относится к классу серин-треониновых протеинкиназ и в опухолевых клетках отвечает за активацию трансляции белков [74]. Белок играет в клетке роль центрального регулятора передачи сигналов. Информация о значении сигнального пути mTOR в развитии и прогрессии НЭО ЖКТ и ПЖ присутствует в ограниченном количестве [75, 76]. Вместе с тем активация сигнального пути mTOR является одним из ключевых

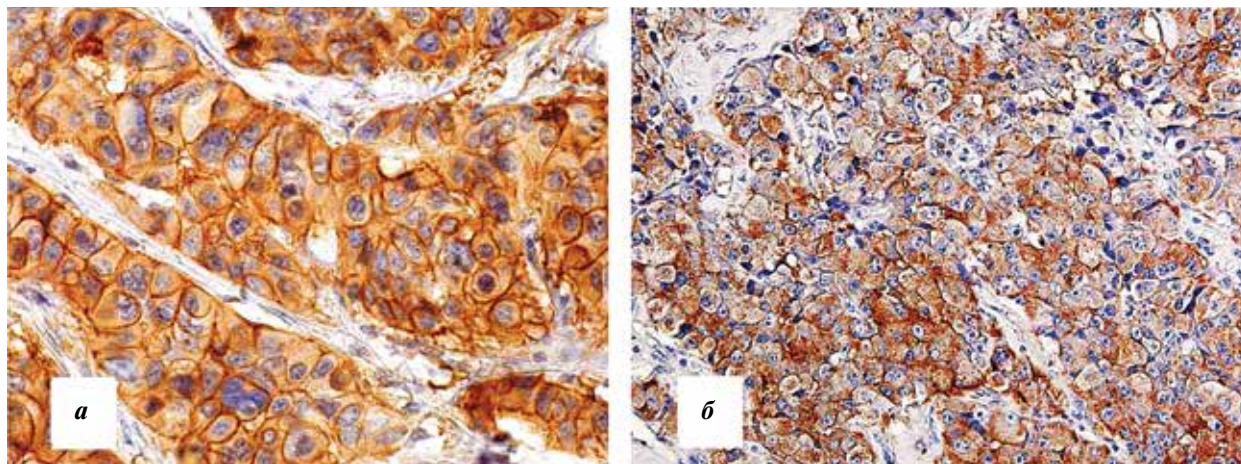


Рис. 3. ИГХ-выявление маркеров лекарственной чувствительности в НЭО ПЖ: а — высокий уровень мембранной экспрессии SSTR2 ($\times 600$); б — выраженная экспрессия p-mTOR в цитоплазме большинства клеток опухоли ($\times 400$). Ядра клеток окрашены гематоксилином Майера

событий, влияющих на рост, пролиферацию, ангиогенез и метаболизм нейроэндокринных опухолевых клеток [77–79]. В последнее время особое внимание к изучению экспрессии белка mTOR, а также выше- и нижележащих молекул данного сигнального пути связано с появлением препаратов из группы ингибиторов mTOR для лечения НЭН ПЖ и других отделов пищеварительной системы. При этом высокая экспрессия p-mTOR в клетках НЭО ПЖ и других отделов ЖКТ является важным параметром, определяющим роль ингибиторов mTOR как эффективных терапевтических агентов [80, 81]. Кроме того, показано, что ИГХ-экспрессия mTOR и нижележащих молекул данного сигнального пути (RPS6KB1, RPS6 и EIF4EBP1) связана с высоким индексом пролиферации (Ki-67) и неблагоприятным прогнозом заболевания [82].

Таким образом, белок mTOR следует рассматривать как потенциальный прогностический маркер и терапевтическую мишень при НЭО пищеварительной системы, при этом необходимо дальнейшее изучение связи его ИГХ-экспрессии с клиническим течением и эффективностью лечения заболевания (рис. 3б).

Данные о зависимости между молекулярным профилем опухоли и ответом на лечение, а также прогнозом течения заболевания в настоящее время только

накапливаются. Тем не менее очевидно, что в ближайшем будущем будут усовершенствованы методы определения специфических молекулярно-биологических характеристик НЭО пищеварительной системы и эта информация приобретет важное практическое значение.

Заключение

В течение последних лет достигнут значительный прогресс в понимании морфологических особенностей и молекулярных механизмов развития НЭО пищеварительной системы. Наряду с гистологическим анализом опухоли в процессе морфологической диагностики большое значение имеет определение клеточного иммунофенотипа, пролиферативной активности и молекулярных параметров, отражающих особенности биологического поведения и лекарственной чувствительности новообразования.

Необходимы дальнейшие исследования для совершенствования современной номенклатуры и классификации НЭО пищеварительной системы, а также разработки более специфичных молекулярных маркеров, которые служили бы дополнительными диагностическими и прогностическими показателями и новыми потенциальными мишенями для противоопухолевой таргетной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klöppel G. Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21(1):15–31.
2. Klöppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 2011;18 Suppl 1:S1–16.
3. Modlin I. M., Oberg K., Chung D. C. et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 2008;9(1):61–72.
4. Öberg K. E. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl 7):vii72–80.
5. 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. *Review. J Clin Oncol* 2008;26(18):3063–72.
6. Oberndorfer S. Kazinoide tumoren des Dunndarms. *Z Pathol Frankf* 1907;1:426–32.
7. Soga J. The term «carcinoid» is a misnomer: the evidence based on local invasion. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:15.
8. Anlauf M., Gerlach P., Schott M. et al. Pathology of neuroendocrine neoplasms. *Chirurg* 2011;82(7):567–73.
9. Caplin M., Yao J. C. An overview of thoracic and gastrointestinal neuroendocrine tumours. In: Caplin M., Yao J. C. (eds.). *Handbook of gastroenteropancreatic and*

- thoracic neuroendocrine tumours. BioScientifica, 2011. Pp. 1–9.
10. Reid M. D., Balci S., Saka B., Adsay N. V. Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocr Pathol* 2014;25(1):65–79.
 11. Zhou C., Zhang J., Zheng Y., Zhu Z. Pancreatic neuroendocrine tumors: a comprehensive review. *Int J Cancer* 2012;131(5):1013–22.
 12. Ordóñez N. G., Mackay B. Electron microscopy in tumor diagnosis: indications for its use in the immunohistochemical era. *Hum Pathol* 1998;29(12):1403–11.
 13. Kandel R., Bedard Y. C., Fan Q. H. Value of electron microscopy and immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumors. *Ultrastruct Pathol* 1998;22(2):141–6.
 14. Öberg K. Carcinoid tumors: molecular genetics, tumor biology, and update of diagnosis and treatment. *Curr Opin Oncol* 2002;14(1):38–45.
 15. Rindi G., Wiedenmann B. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: new insights. *Nat Rev Endocrinol* 2011;8(1):54–64.
 16. Partelli S., Maurizi A., Tamburrino D. et al. GEP-NETS update: a review on surgery of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Eur J Endocrinol* 2014;171(4):R153–62.
 17. Strosberg J. R., Nasir A., Hodul P., Kvols L. Biology and treatment of metastatic gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Gastrointest Cancer Res* 2008;2(3):113–25.
 18. Pape U. F., Berndt U., Muller-Nordhorn J. et al. Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(4):1083–97.
 19. Solcia E., Klöppel G., Sobin L. Histological typing of endocrine tumours. 2nd ed. WHO, Berlin: Springer, 2000.
 20. 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.
 21. Perren A., Schmitt A., Komminoth P., Pavel M. Classification of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. *Radiologe* 2009;49(3):198–205.
 22. 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.
 23. Klöppel G., Rindi G., Perren A. et al. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch* 2010;456(6):595–7.
 24. Scarpa A., Mantovani W., Capelli P. et al. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Mod Pathol* 2010;23(6):824–33.
 25. Strosberg J., Nasir A., Coppola D. et al. Correlation between grade and prognosis in metastatic Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Hum Pathol* 2009;40(9):1262–68.
 26. Bosman F. T., Carneiro F. T., Hrubon R. H. et al. (eds.) World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2010.
 27. Yang M., Tian B. L., Zhang Y. et al. Evaluation of the World Health Organization 2010 grading system in surgical outcome and prognosis of pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas* 2014;43(7):1003–8.
 28. Scoazec J. Y., Couvelard A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: what must the pathologist know and do in 2014? *Ann Pathol* 2014;34(1):40–50.
 29. 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.
 30. Krieg A., Mersch S., Boeck I. et al. New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. *PLoS One* 2014;9(2):e88713.
 31. Kachare S. D., Liner K. R., Vohra N. A. et al. A modified duodenal neuroendocrine tumor staging schema better defines the risk of lymph node metastasis and disease-free survival. *Am Surg* 2014;80(8):821–6.
 32. Rindi G., Bordi C., Rappel S. et al. Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. *World J Surg* 1996;20(2):169–72.
 33. Krampitz G. W., Norton J. A., Poultides G. A. et al. Lymph nodes and survival in pancreatic neuroendocrine tumors. *Arch Surg* 2012;147(9):820–7.
 34. Ricci C., Casadei R., Taffurelli G. et al. WHO 2010 classification of pancreatic endocrine tumors. Is the new always better than the old? *Pancreatol* 2014;14(6):539–41.
 35. Shi C., Klimstra D. S. Pancreatic neuroendocrine tumors: pathologic and molecular characteristics. *Semin Diagn Pathol* 2014;31(6):498–511.
 36. Amador Cano A., García F., Espinoza A. et al. Nonfunctional neuroendocrine tumor of the pancreas: Case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep* 2013;4(2):225–8.
 37. Panzuto F., Boninsegna L., Fazio N. et al. Metastatic and locally advanced pancreatic endocrine carcinomas: analysis of factors associated with disease progression. *J Clin Oncol* 2011;29(17):2372–7.
 38. Klimstra D. S. Pathology reporting of neuroendocrine tumors: essential elements for accurate diagnosis, classification, and staging. *Semin Oncol* 2013;40(1):23–36.
 39. Remes S. M., Tuominen V. J., Helin H. et al. Grading of neuroendocrine tumors with Ki-67 requires high-quality assessment practices. *Am J Surg Pathol* 2012;36(9):1359–63.
 40. Adsay V. Ki67 labeling index in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal and pancreatobiliary tract: to count or not to count is not the question, but rather how to count. *Am J Surg Pathol* 2012;36(12):1743–6.
 41. Jamali M., Chetty R. Predicting prognosis in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumors: an overview and the value of Ki-67 immunostaining. *Endocr Pathol* 2008;19(4):282–8.
 42. Boninsegna L., Panzuto F., Partelli S. et al. Malignant pancreatic neuroendocrine tumour: lymph node ratio and Ki67 are predictors of recurrence after curative resections. *Eur J Cancer* 2012;48(11):1608–15.
 43. 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.
 44. DeLellis R. A., Shin S. J., Treaba O. D. Chapter 10: Immunohistology of endocrine tumors. In: Dabbs D. J. (ed.) *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. 3rd ed. Elsevier Inc., 2010. Pp. 291–329.
 45. Mertz H., Vyberg M., Paulsen S. M., Teglbjærg P. S. Immunohistochemical detection of neuroendocrine markers in tumors of the lungs and gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem* 1998;6:175–80.
 46. 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.
 47. Marchevsky A. M., Gupta R., Balzer B. Diagnosis of metastatic neoplasms: a clinicopathologic and morphologic approach. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(2):194–206.
 48. Krishna M. Diagnosis of metastatic neoplasms: an immunohistochemical approach. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(2):207–15.
 49. Couvelard A., Deschamps L., Ravaud P. et al. Heterogeneity of tumor prognostic markers: a reproducibility study applied to liver metastases of pancreatic endocrine tumors. *Mod Pathol* 2009;22(2):273–81.
 50. Leteurtre E. Pathologic diagnostic for a primary of metastatic neuroendocrine tumor. *Ann Pathol* 2011;31(5 Suppl):S79–80.
 51. Sagi A., Alexis D., Remotti F., Bhagat G. Usefulness of CDX2 and TTF-1 in differentiating gastrointestinal from pulmonary carcinoids. *Am J Clin Pathol* 2005;123(3):394–404.
 52. Kaufmann O., Dietel M. Expression of thyroid transcription factor-1 in

- pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology* 2000;36(5):415–20.
53. Schmitt A. M., Riniker F., Anlauf M. Islet 1 (Isl1) expression is a reliable marker for pancreatic endocrine tumors and their metastases. *Am J Surg Pathol* 2008;32(3):420–5.
54. Srivastava A., Hornick J. L. Immunohistochemical staining for CDX-2, PDX-1, NESP-55, and TTF-1 can help distinguish gastrointestinal carcinoid tumors from pancreatic endocrine and pulmonary carcinoid tumors. *Am J Surg Pathol* 2009;33(4):626–32.
55. Couvelard A. Ki67 and neuroendocrine tumors. *Ann Pathol* 2011;31(5 Suppl):S55–6.
56. Öberg K., Jelic S. Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: ESMO clinical recommendation for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20(Suppl 4):150–3.
57. Palazzo M., Lombard-Bohas C., Cadot G. et al. Ki67 proliferation index, hepatic tumor load, and pretreatment tumor growth predict the antitumoral efficacy of lanreotide in patients with malignant digestive neuroendocrine tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25(2):232–8.
58. Tang L. H., Gonen M., Hedvat C. et al. Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. *Am J Surg Pathol* 2012;36(12):1761–70.
59. Yang Z., Tang L. H., Klimstra D. S. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *Am J Surg Pathol* 2011;35(6):853–60.
60. Rindi G., Bordi C. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: etiology, molecular pathogenesis and genetics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19(4):519–34.
61. Cives M., Strosberg J. An update on gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncology (Williston Park)* 2014;28(9). pii: 201359.
62. Modlin I. M., Pavel M., Kidd M., Gustafsson B. I. Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31(2):169–88.
63. Raymond E., Faivre S. Learning experiences with sunitinib continuous daily dosing in patients with pancreatic neuroendocrine tumours. *Curr Oncol* 2014;21(6):309–17.
64. Abdel-Rahman O. Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and neuroendocrine neoplasms (NENs): prognostic and therapeutic considerations. *Tumour Biol* 2014;35(11):10615–25.
65. Scoazec J. Y. Angiogenesis in neuroendocrine tumors: therapeutic applications. *Neuroendocrinology* 2013;97(1):45–56.
66. Leung R., Lang B., Wong H. et al. Advances in the systemic treatment of neuroendocrine tumors in the era of molecular therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2013;13(3):382–8.
67. Oberg K. E., Reubi J. C., Kwekkeboom D. J., Krenning E. P. Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 2010;139(3):742–53.
68. Grozinsky-Glasberg S., Shimon I., Korbonits M., Grossman A. B. Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(3):701–20.
69. Sidéris L., Dubé P., Rinke A. Antitumor effects of somatostatin analogs in neuroendocrine tumors. *Oncologist* 2012;17(6):747–55.
70. Strosberg J., Kvols L. Antiproliferative effect of somatostatin analogs in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World Gastroenterol* 2010;16(24):2963–70.
71. Schmida H. A., Lambertini C., van Vugta H. H. et al. Monoclonal antibodies against the human somatostatin receptor subtypes 1–5: development and immunohistochemical application in neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2012;95(3):232–47.
72. Volante M., Brizzi M. P., Faggiano A. et al. Somatostatin receptor type 2a immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol* 2007;20(11):1172–82.
73. Körner M., Waser B., Schonbrunn A. et al. Somatostatin receptor subtype 2a immunohistochemistry using a new monoclonal antibody selects tumors suitable for in vivo somatostatin receptor targeting. *Am J Surg Pathol* 2012;36(2):242–52.
74. Showkat M., Beigh M. A., Andrabi K. I. mTOR signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions. *Mol Biol Int* 2014;2014:686984.
75. Cingarlini S., Bonomi M., Corbo V. Profiling mTOR pathway in neuroendocrine tumors. *Target Oncol* 2012;7(3):183–8.
76. Wolin E. M. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in the therapy of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Lett* 2013;335(1):1–8.
77. Zhou C. F., Ji J., Yuan F. et al. mTOR activation in well differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: a retrospective study on 34 cases. *Hepatogastroenterology* 2011;58(112):2140–3.
78. Catena L., Bajetta E., Milione M. et al. Mammalian target of rapamycin expression in poorly differentiated endocrine carcinoma: clinical and therapeutic future challenges. *Target Oncol* 2011;6(2):65–8.
79. Geis C., Fendrich V., Rexin P. et al. Ileal neuroendocrine tumors show elevated activation of mammalian target of rapamycin complex. *J Surg Res* 2014. pii: S0022–4804(14)00982–2.
80. Yao J. C., Shah M. H., Ito T. et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364(6):514–23.
81. Boussaha T., Rougier P., Taieb J., Lepere C. Digestive neuroendocrine tumors (DNET): the era of targeted therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013;37(2):134–41.
82. 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.

Биохимические маркеры метастазирования в кости

Н. В. Любимова, Н. Е. Кушлинский

ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Нина Васильевна Любимова biochimia@mtu-net.ru

Метастазирование в кости — одно из наиболее частых и опасных осложнений злокачественных опухолей. Достижения последних лет в изучении молекулярных механизмов костного ремоделирования способствовали поиску чувствительных и специфичных критериев, отражающих интенсивность процессов остеолиза и остеосинтеза при метастатическом поражении скелета. В обзоре охарактеризованы наиболее информативные и получившие внедрение в клиническую практику биохимические маркеры формирования и резорбции костной ткани. Приведены данные об их возможном использовании в диагностике, мониторинге и прогнозе поражения скелета злокачественными опухолями разной локализации. Интерес к биохимическим маркерам костного ремоделирования как неинвазивным методам обследования онкологических больных усиливается по мере внедрения в клиническую практику современных лабораторных технологий. Работы последних лет свидетельствуют о возможности их применения не только в целях мониторинга и прогноза, но и для проведения ранней диагностики метастазов в костях. Представлены результаты собственных исследований ключевых биохимических маркеров остеолиза (С-концевого телопептида коллагена I типа (СТХ)) и остеосинтеза (костной щелочной фосфатазы (КЩФ)) на основе иммуноферментного анализа в сыворотке крови 238 больных раком молочной железы (РМЖ). Установлена зависимость секреции КЩФ и СТХ от клинических проявлений метастазов в костях: достоверное увеличение их уровней зависело от степени поражения скелета ($p < 0,02-0,00001$), наличия патологического перелома ($p < 0,005-0,0001$) и выраженности болевого синдрома ($p < 0,01-0,00002$). Усиление интенсивности процессов костного ремоделирования было связано с достоверным уменьшением показателей общей выживаемости больных РМЖ. Высокодостоверные различия общей 5-летней выживаемости, рассчитанной с учетом пороговых уровней СТХ (0,74 нг/мл) и КЩФ (43,7 Ед/л), были получены для больных РМЖ как с исходными костными метастазами, так и без поражения скелета. СТХ и КЩФ являются биохимическими критериями, имеющими самостоятельное значение в мониторинге и прогнозе метастатического поражения скелета у больных РМЖ.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, метастазы в костях, биохимические маркеры, сыворотка крови, С-концевой телопептид коллагена I типа, костная щелочная фосфатаза, диагностика, мониторинг, прогноз

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.061-075

Biochemical markers of bone metastasis

N. V. Lyubimova, N. E. Kushlinskiy

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia

Bone metastasis is one of the most frequent and dangerous complications of malignant tumors. The last years' achievements in the study of bone remodeling mechanisms promoted the search of sensitive and specific criteria reflecting the intensity of osteolysis and osteosynthesis in bone metastatic lesions. The most informative and clinically valid biochemical markers of bone formation and resorption are characterized in this review. The data on their possible implications in diagnostics, monitoring and prognosis of skeletal lesions by various malignant tumors are presented. The attention to biochemical markers of bone remodeling as noninvasive methods for oncologic patients examination is gradually increasing with adoption of modern laboratory technologies to clinical practice. The last years' publications suggest the possibility of their use both for monitoring, prognosis and early diagnostics of bone metastasis. We present the results of our own investigation of serum C-telopeptide of type I collagen (CTX) as bone resorption marker and bone-specific alkaline phosphatase (BAP) as formation marker in 238 breast cancer patients using ELISA methods. The elevation of studied biochemical parameters in breast cancer patients was significantly associated with the extent of skeletal metastases ($p < 0.02-0.00001$), pathological fractures ($p < 0.005-0.0001$) and the severity of pain ($p < 0.01-0.00002$). Elevated rate of bone turnover was associated with reduced overall survival of breast cancer patients. The significant difference of overall survival estimated on a base of cut-off values of CTX (0.74 ng/ml) and BAP (43.7 IU/L) was found both in the groups of breast cancer patients with and without bone metastases. Serum CTX and BAP are of value in monitoring and predicting the status of breast cancer bone metastases.

Key words: malignant tumors, bone metastases, biochemical markers, blood serum, C-terminal telopeptide of type I collagen, bone-specific alkaline phosphatase, diagnostics, monitoring, prognosis

Введение

Метастазирование в кости — частое и опасное осложнение злокачественных опухолей, которое снижает продолжительность и качество жизни пациентов,

вызывая сильные боли, патологические переломы, гиперкальциемию и компрессию спинного мозга. Наиболее часто в кости метастазирует рак простаты (54–85 %), рак молочной железы (РМЖ; 47–85 %), рак

щитовидной железы (РЩЖ; 28–60 %), легкого и почки (32–40 %), мочевого пузыря (40–42 %) [1].

Своевременная диагностика метастазов в костях необходима для правильного планирования лечения и оценки прогноза. Используемые в клинической практике инструментальные методы исследования скелета обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью. Так, рентгенография – наиболее распространенный метод диагностики метастазов в костях – позволяет выявлять их поражение только при деминерализации костной ткани на 30–40 %. Более чувствительным методом считают сцинтиграфию, которая обнаруживает деструктивные процессы на ранних стадиях, однако накопление индикатора в местах со сниженной плотностью костной ткани независимо от характера ее изменения делает этот метод весьма неспецифичным.

В последнее время возрос интерес к разработке неинвазивных методов диагностики поражения скелета у онкологических больных, что обусловлено, прежде всего, интенсивными исследованиями патогенеза метастазирования, а также появлением новых подходов в лечении метастазов в кости [2].

Современные представления о костном ремоделировании

Остеокласты. После окончания роста скелет претерпевает процесс обновления костной ткани, который называют ремоделированием. Костное ремоделирование – непрерывный и хорошо скоординированный процесс, который помогает устранить микроповреждения в костном матриксе, возникающие в течение жизни, сохранить архитектуру костей и поддерживать их прочность. В норме в скелете взрослого человека постоянно протекают два связанных и строго сбалансированных процесса: разрушение старой костной ткани остеокластами и формирование нового матрикса остеобластами, берущими начало от предшественников различных клеточных линий: остеобласты – из мезенхимальных стволовых клеток, остеокласты – из макрофагально-моноцитарных клеток костного мозга [3, 4]. При этом резорбция костной ткани предшествует костеобразованию. В процессе репарации кости происходит обновление (без увеличения или потери костной массы) приблизительно 25 % губчатой кости и 3 % кортикальной кости ежегодно [5].

Остеокласты – многоядерные клетки, постоянно образующиеся из макрофагов, основной функцией которых является разрушение костного матрикса путем образования характерных лакун [6]. Созревание, дифференцировка и апоптоз остеокластов контролируются локально цитокинами и системными гормонами, в том числе колониестимулирующим фактором макрофагов и лигандом рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF- κ B (RANKL).

Наиболее выраженное влияние на активность остеокластов оказывают кальцитонин, витамин D и локально действующие факторы роста и цитокины

(TGF- α , TNF α , TNF β , IL-1, IL-6) [4]. Известно, что паратиреоидный гормон (ПТГ), кальцитриол и простагландины не оказывают непосредственного действия на остеокласты, а влияют на их образование и дифференцировку именно через увеличение продукции RANKL остеобластами и клетками стромы [7].

Непосредственное действие остеокластов осуществляется за счет секреции в межклеточное пространство, отграниченное клеточной мембраной с одной стороны и минеральной частью кости с другой (резорбционную полость), протеолитических ферментов (тартрат-резистентной кислой фосфатазы (ТРКФ), катепсина К), расщепляющих белки матрикса и соляной кислоты, синтезируемой цитоплазматической карбоангидразой и растворяющей гидроксиапатит. Наиболее важным из ферментов остеокластов, принимающих непосредственное участие в процессах костной резорбции, является ТРКФ, катализирующая реакции гидролиза фосфопротеинов, в частности остеопонтина, остеонектина и костного сиалопротеина.

Значительный прогресс в понимании процессов костного ремоделирования был достигнут с открытием цитокиновой системы RANKL–RANK–OPG, играющей ключевую роль в формировании, дифференцировке и регуляции активности остеокластов [8]. Открытие этой системы стало краеугольным камнем для понимания патогенеза остеопороза, остеокластогенеза и регуляции костной резорбции, а также других процессов, вовлеченных в локальное ремоделирование кости [9]. В систему регуляции остеокластогенеза входит остеопротегерин (OPG) – растворимый рецептор-ловушка RANKL, который, связываясь с лигандом, блокирует его взаимодействие с родственным рецептором, вызывая торможение дифференцировки и активации остеокластов. Все три белка относятся к суперсемейству TNF, играя ключевую роль в образовании и активации остеокластов, а взаимодействие между RANKL и OPG определяет интенсивность остеокластогенеза [4]. Представленные данные подтверждены в экспериментах на животных с нокаутом генов, отвечающих за синтез этих белков. Так, при нарушении продукции OPG развивается остеопороз, а при дефиците RANKL повышается интенсивность процессов костеобразования [10]. Известно, что RANKL связывается со своим рецептором (RANK) на макрофагах и неактивных остеокластах и вызывает активацию и дифференцировку этих клеток, действуя через NF- κ B и N-концевую киназу (JNK) [3, 6, 11].

Некоторые факторы при метастатическом поражении костей могут оказывать двойное влияние на соотношение RANKL/OPG. Такие вещества, как ПТГ-подобный протеин (ПТГпП), IL-1, простагландин E₂, способны стимулировать активность остеокластов в костной строме – как путем усиления действия RANKL, так и за счет снижения уровня OPG [11]. Примечательно, что воздействие RANKL на некоторые клеточные линии приводит к активации факторов, ответст-

венных за миграцию, инвазию и метастазирование. Так, была доказана ключевая роль RANKL в нарушении регуляции EMMPRIN/CD47 матриксных металлопротеиназ, ICAM-1, IL-6, IL-8, а также VEGF, индуцирующих развитие очагов остеолита [12].

Выраженное влияние RANKL и OPG на дифференцировку остеокластов открывает перспективы для исследования возможности использования антител к RANKL и рекомбинантных генов OPG для лечения заболеваний скелета, сопровождающихся усилением остеолита, в том числе его метастатического поражения. При этом для оценки действия ингибиторов остеокластов полезна оценка фармакодинамики маркеров костной резорбции, таких как NTX, повышенные уровни которого ассоциируются с высоким риском метастазирования в кости и более высоким уровнем смертности пациентов [13]. Одним из первых антагонистов RANKL является рекомбинантный OPG (Fc-OPG, Amgen), эффект которого впервые продемонстрирован на пациентах с множественной миеломой и РМЖ, осложненным поражением костей. В ходе терапии отмечали снижение уровней биомаркеров резорбции (включая uNTX/Cr), однако клиническое использование Fc-OPG так и не получило развития из-за сравнительно короткого периода полураспада препарата и возможного риска активации иммунного ответа на эндогенный OPG [14]. Разработан и апробирован другой препарат OPG — CEP-37251 (Cephalon), однако и его исследование также не увенчалось успехом [15]. Антитела к RANKL — ALX-0141 (Ablynx) протестированы в клиническом исследовании I фазы на здоровых женщинах в постменопаузе [16]. Генуинные человеческие антитела к RANKL — AMG 162 (Denosumab), обладающие высокой селективностью к человеческому RANKL, в ходе клинического исследования I фазы приводили к снижению экскреции маркера костной резорбции NTX и не вызывали серьезных побочных эффектов. Исследования II фазы препарата Denosumab показали эффективность и безопасность его применения у больных РМЖ, осложненным поражением костей, а также при костных метастазах рака простаты и множественной миеломе [17].

Остеобласты. За стадией резорбции костной ткани в норме всегда следуют процессы костеобразования, осуществляемые остеобластами, образующимися из мезенхимальных стволовых клеток. Основным фактором, от которого зависит дифференцировка остеобластов, является транскрипция CBFA1 (core-binding factor $\alpha 1$). Механизмы дифференцировки остеобластов изучены недостаточно, однако известно, что молодые клетки синтезируют главным образом костную щелочную фосфатазу (КЩФ), в то время как зрелые клетки синтезируют остеокальцин и осуществляют процессы кальцификации, превращаясь в остециты. Рост и дифференцировку остеобластов также способны стимулировать PIGF, FGF- β и TGF- β .

Закономерности биохимических нарушений костного метаболизма при метастазировании в кости

Костные метастазы по характеру деструкции ткани разделяют на литические и пластические. Наличие выраженной взаимосвязи между процессами остеолита и костеобразования в норме и при патологических процессах в костях позволяет рассматривать любое метастатическое поражение как смешанное с преобладанием литического или пластического компонента. Наиболее выраженные процессы остеолита наблюдаются при поражении скелета клетками РМЖ и при множественной миеломе, напротив, при метастазировании рака простаты преобладают пластические процессы.

Существует несколько современных представлений о механизмах костной деструкции при злокачественных процессах. В более ранних работах основное внимание уделяли непосредственному разрушающему воздействию злокачественных клеток на костную ткань в результате секреции высокоактивных протеолитических ферментов, включая коллагеназы. Однако очевидно, что местное деструктивное действие раковых клеток не может проявляться на ранних стадиях развития опухолей, поскольку их проникновение в костную ткань представляет собой многоступенчатый, длительный и сложный процесс. Научные достижения последнего десятилетия способствовали пониманию механизмов костного ремоделирования в норме и возможных путей его нарушения при злокачественном росте. Так, в настоящее время одним из главных механизмов метастатической деструкции костей признается активация остеокластов в результате системного действия на них паракринных факторов, продуцируемых злокачественными клетками (TGF- β , PIGF, IGF-I, IGF-II, FGF, VEGF) [18, 19]. Работами разных авторов доказано, что стимулирование остеокластогенеза осуществляется опухолевыми клетками и зависит от вида опухоли [6, 20]. Так, при множественной миеломе скопления остеокластов наблюдают только в участках костной ткани, контактирующих с опухолевыми клетками, что сопровождается выраженным преобладанием литических процессов. Идентифицированы факторы, стимулирующие активацию и дифференцировку остеокластов при множественной миеломе (IL-1, IL-6, воспалительный белок макрофагов, RANKL) [21]. IL-1 — мощный стимулятор формирования остеокластов, однако существенного увеличения его экспрессии в очагах миеломы не обнаружено. В то же время IL-6 — мощный стимулятор дифференцировки остеокластов, он блокирует апоптоз клеток миеломы и присутствует в повышенных количествах в сыворотке крови пациентов. По мнению большинства исследователей, главным фактором, стимулирующим формирование и дифференцировку остеокластов, считают RANKL, продуцируемый клетками миеломы [22]. Это предположение подтверждено R. N. Pearce et al. [23], показавшими достоверное снижение OPG и увеличение RANKL в микроокружении клеток миеломы.

В экспериментах данное наблюдение подтвердилось – отмечено повышение интенсивности резорбции костной ткани у животных с миеломной болезнью в результате блокирования OPG и ее увеличение при нарушении взаимодействия RANKL с рецептором RANK. Еще одним мощным индуктором резорбции при множественной миеломе считают воспалительный белок макрофагов, а некоторые исследователи отводят ключевую роль именно ему [24]. У больных этот белок синтезируют около 70 % клеток миеломы, а в экспериментальных исследованиях в клетках миеломы наблюдается активация гена, ответственного за синтез воспалительного белка макрофагов [25]. У мышей, лишенных данного гена, наблюдали выраженное снижение интенсивности костной резорбции при множественной миеломе. Воспалительный белок макрофагов также усиливает адгезивные взаимодействия опухолевых клеток с клетками стромы, способствуя дальнейшему увеличению его продукции, а также повышению синтеза RANKL и IL-6, что приводит к прогрессированию остеолита и опухолевого роста [24, 26].

Столь выраженная активность процессов резорбции и практически полное отсутствие костеобразования при множественной миеломе предполагают продукцию клетками белковых факторов, не только стимулирующих остеокласты, но и вызывающих нарушение действия остеобластов. Возможно, таким белком является dickkopf-1 (DKK-1) [27] – один из белковых факторов сигнального пути Wnt, отвечающего за дифференцировку остеобластов [28]. Данный сигнальный путь включает большую группу белков и ядерных рецепторов, основным из которых является рецептор липопroteина низкой плотности (LRP5). В результате взаимодействия с этим рецептором сигнального белка Wnt происходит активация β -катенина, стимулирующего остеобластогенез. DKK-1 способен связывать рецепторы сигнального пути Wnt и блокировать дифференцировку и пролиферацию остеобластов. Использование антител к DKK-1 у экспериментальных животных с множественной миеломой уменьшало интенсивность резорбции и стимулировало остеосинтез [27]. Некоторые исследователи отметили значительное увеличение концентрации DKK-1 у больных множественной миеломой [29], раком легкого, пищевода, простаты, РМЖ с метастазами в костях [30, 31]. Перспективы изучения механизмов сигнального пути Wnt связаны с поиском новых таргетных препаратов и маркеров костного ремоделирования.

Другим важным аспектом патогенеза остеолита при множественной миеломе является снижение функциональной компетенции остеобластов, доказанное при морфометрическом исследовании биопсийного материала нормальной костной ткани и очагов деструкции. Аналогичные закономерности отмечены при опухолях различного гистогенеза, включая РМЖ, РЩЖ, рак легкого и некоторые другие опухоли, способные продуцировать и секретировать в кровь цито-

кины, факторы роста и ряд биологически активных соединений, которые оказывают стимулирующий эффект на остеокласты. G. R. Mundy et al. на основании собственных и обобщенных литературных данных указывают на критическую для развития и прогрессии костных метастазов роль таких цитокинов, как IL-1, IL-6, а также факторов роста (EGF, TGF- β , TGF- α , IGF) и простагландинов, которые, с одной стороны, проявляют активирующее действие на остеокласты, а с другой – ингибирующее действие на остеобласты [32]. Со времени выделения в 1987 г. из клеток рака легкого специфического белка, обладающего активностью ПТГ и получившего название ПТГпП, эктопической продукции раковыми клетками этого белка придается особое значение в развитии остеолита и гиперкальциемии, сопровождающей деструкцию костной ткани [33]. При иммуногистохимических исследованиях установлена экспрессия ПТГпП в разных типах плоскоклеточного рака, рака легкого, почки, РМЖ, при этом с максимальной частотой ПТГпП экспрессируется именно в клетках костных метастазов. Уровень ПТГпП и выраженность его экспрессии в злокачественных клетках предложено использовать в качестве фактора прогноза метастазирования опухолей в кости с последующим формированием групп риска для проведения профилактического лечения [33]. Таким образом, наиболее распространенный остеолитический характер поражения скелета реализуется при нарушении баланса между процессами резорбции и формирования костной ткани, которое возникает в результате активации или увеличения количества остеокластов, а также при снижении количества или функциональной компетенции остеобластов.

В то же время некоторые опухоли могут секретировать факторы, оказывающие системное действие на остеобласты, вызывая их образование или активацию. В клинике эти данные пока не подтверждены, однако в эксперименте получены прямые и косвенные доказательства способности некоторых типов раковых клеток, в частности клеток рака простаты, продуцировать TGF- β и IGF, фрагменты урокиназы, обладающие стимулирующим эффектом на пролиферацию и активность остеобластов. Получены данные, свидетельствующие о способности клеток РМЖ секретировать факторы, стимулирующие остеобласты [32]. Стало быть, в развитии остеосклероза важную роль могут играть паракринные факторы, усиливающие костеобразование, хотя до последнего времени общепринятым считали механизм усиления формирования костной ткани в ответ на интенсивную резорбцию.

Гиперкальциемия. Одним из наиболее важных признаков, сопровождающих поражение скелета и существенно ухудшающих прогноз, является гиперкальциемия, обнаруживаемая у 10–30 % онкологических больных. Гиперкальциемия можно наблюдать не только у больных с клиническими признаками поражения скелета, но и при отсутствии таковых, что обознача-

ется как гуморальная гиперкальциемия злокачественного роста. Одним из главных механизмов гуморальной гиперкальциемии, которую наиболее часто обнаруживают при раке легкого, мочевого пузыря, РМЖ, считают секрецию злокачественными клетками вышеописанных биологически активных факторов, способных оказывать прямое или косвенное влияние на костное remodelирование и минеральный гомеостаз. Однако гиперкальциемия в редких случаях можно наблюдать и у больных с бластическим типом метастазов, что отражает сложность патогенетических механизмов костной деструкции при злокачественных опухолях.

Бисфосфонаты. В настоящее время наиболее эффективными препаратами, снижающими интенсивность резорбции и потерю костной массы при заболеваниях скелета различной этиологии, считают бисфосфонаты. Механизм действия бисфосфонатов основан на их способности ингибировать активность остеокластов, а также снижать интенсивность процессов кальцификации при депонировании препарата, обладающего высоким сродством к гидроксипатиту в минеральной части костного матрикса. В настоящее время бисфосфонаты (памидронат, клодронат, ибандронат) широко используют в клинической практике при заболеваниях скелета метаболического характера, а также применяют при лечении костных метастазов [34].

Биохимические маркеры костного remodelирования

Достижения последних лет в изучении молекулярных механизмов костного remodelирования способствовали поиску чувствительных и специфичных критериев, отражающих интенсивность процессов резорбции и формирования костной ткани. Наиболее информативные из них, получившие внедрение в клиническую практику в качестве маркеров формирования и резорбции костной ткани при заболеваниях скелета, представлены в табл. 1.

Маркеры формирования костной ткани

ЩФ (КФ 3.1.3.1) — маркер, широко используемый в клинической практике. Функционально активный фермент в клетке имеет структуру тетрамера, прикрепленного к клеточной мембране С-концевым углеводным фрагментом, содержащим фосфатидилинозитол. Специфичность структуры тетрамеров обеспечивает связь фермента с наружной поверхностью клеточной мембраны, что, в свою очередь, делает их доступными для воздействия фосфолипаз С и D. Полагают, что именно благодаря действию этих ферментов ЩФ присутствует в сыворотке крови в виде димера. ЩФ отщепляет неорганический фосфор от органического фосфата, способствуя образованию фосфата кальция и последующей минерализации костной ткани, а так-

Таблица 1. Основные биохимические маркеры метаболизма костной ткани

Маркеры	Тканевое происхождение	Материал	Методы определения
Маркеры костеобразования			
Общая активность щелочной фосфатазы (ЩФ) (AP)	Костная ткань, печень, почки, кишечник	Кровь	Колориметрия
Костный изофермент ЩФ (BAP)	Костная ткань	Кровь	Иммуноферментный анализ (ИФА), преципитация с лектином, электрофорез
Остеокальцин (BGP)	Костная ткань, тромбоциты	Кровь	ИФА, радиоиммунный анализ (РИА)
Проколлагеновые пропептиды: С-концевой пропептид (PICP) N-концевой пропептид (PINP)	Костная ткань, мягкие ткани, кожа Костная ткань, мягкие ткани, кожа	Кровь	ИФА, РИА
Маркеры резорбции костной ткани			
Гидроксипролин (ОНР)	Костная ткань, хрящевая ткань, мягкие ткани, кожа, кровь	Моча	Колориметрия, РИА, жидкостная хроматография высокого разрешения (ЖХВР)
Галактозилгидроксизин	Костная ткань, мягкие ткани, кожа	Моча	ЖХВР
Пиридиновые связи коллагена: пиридинолин (PYD) дезоксипиридинолин (DPD)	Костная и хрящевая ткань, связки, сосуды Костная ткань, дентин	Моча	ЖХВР, ИФА, РИА
Коллагеновые пептиды: С-концевой телопептид (ICTP, CTX, CrossLaps) N-концевой телопептид (NTP, NTX)	Костная ткань, кожа	Кровь, моча	РИА, ИФА
	Костная ткань, кожа	Моча	ИФА
ТРКФ (TRAP)	Костная ткань, кровь	Кровь	Колориметрия, ИФА

Примечание. В скобках указаны международные аббревиатуры.

же расщепляет пирофосфат — потенциальный ингибитор минерализации.

ЩФ представляет собой семейство ферментов, отличительным свойством которых является органная специфичность. Синтез изоферментов ЩФ кодируется четырьмя структурными генами с преобладающей экспрессией тканево-неспецифического гена, который кодирует костный, печеночный и почечный изоферменты одновременно. Синтез кишечной и плацентарной фосфатаз кодируют отдельные гены, экспрессирующиеся преимущественно в соответствующих тканях — тонком кишечнике и плаценте. Помимо истинных изоферментов имеются варианты ЩФ, появление которых обусловлено разными модификациями. В тканях и соответственно в сыворотке крови при злокачественных новообразованиях обнаруживают также изоферменты — продукты экспрессии генов, которые кодируют синтез ферментов в эмбриональном периоде [35].

Кодирование печеночного и костного изоферментов одним и тем же геном обеспечивает их сходство, тогда как различия в величине заряда, электрофоретической подвижности, термолабильности, чувствительности к действию активаторов и ингибиторов изоферменты приобретают в результате модификаций на посттрансляционном уровне, в частности вследствие разной степени гликозилирования и сialiрования их молекул [35, 36].

Одним из важных научных фактов, способствующих внедрению КЩФ в клиническую практику, было доказательство того, что изофермент синтезируется остеобластами и его активность в сыворотке крови коррелирует с образованием коллагена, т.е. отражает интенсивность костеобразования на клеточном уровне. В настоящее время общепринятым механизмом фосфатаземии является продукция активированными остеобластами КЩФ с последующей ее секрецией в кровь в процессе формирования и дифференцировки костного матрикса [37]. Экспрессия костного изофермента регулируется многими факторами, включая ПТГ, витамин D, глюкокортикоиды и факторы роста.

В норме костный и печеночный изоферменты — доминирующие фракции, относительное содержание костного изофермента в сыворотке крови составляет 30–50 % от общей активности ЩФ. Несмотря на большой период полураспада (24–48 ч) в сыворотке крови, для костной фракции характерна суточная вариабельность с пиком активности в ночное время. Выводится изофермент в основном печенью, нарушение функции которой в некоторых случаях (первичный билиарный цирроз) приводит к гиперферментемии.

В последние годы в клиническую практику активно внедряют высокочувствительные иммуноферментные методы определения активности КЩФ, применение которых стало возможным после получения высокоспецифичных моноклональных антител.

Остеокальцин — основной неколлагиновый белок костного матрикса, состоящий из 49 аминокислотных

остатков, продуцируется исключительно остеобластами, его относительное содержание в костной ткани составляет 1–2 % от общего белка; идентифицирован С. Р. Price в 1980 г. [38]. Остеокальцин рассматривают в качестве одного из наиболее специфичных маркеров активности остеобластов. В молекуле остеокальцина присутствуют три остатка глутаминовой кислоты, которые посредством витамин-К-зависимого процесса карбоксилируются и приобретают таким образом высокое сродство к гидроксиапатиту. В связанной с гидроксиапатитом форме остеокальцин встраивается во внеклеточный матрикс костной ткани. Небольшая часть белка, не включенного в костный матрикс, поступает в циркуляторное русло и может быть определена в сыворотке крови в виде интактной молекулы. Однако в сыворотке крови обнаруживают также фрагменты остеокальцина, которые представляют собой продукт деградации костного матрикса.

Физиологическая роль остеокальцина до конца не определена. Есть предположения об участии белка в процессах минерализации как мессенджера витамина D. Остеокальцин ингибирует преципитацию гидроксиапатита и способен путем хемотаксиса привлекать клетки-предшественники остеокластов, способствуя тем самым замедлению процессов резорбции. Установлено, что экспрессия остеокальцина регулируется различными гормонами и факторами роста, в частности витаминами К и D, тиреоидными гормонами, инсулином, эстрогенами, активирующими синтез белка, тогда как информация о влиянии ПТГ и кальцитонина неоднозначна.

Несмотря на то, что остеокальцин и КЩФ продуцируются остеобластами и в определенной степени отражают их активность, маркеры различаются по своей экспрессии, которая проявляется на разных этапах развития остеобластов, в связи с чем между ними не всегда наблюдается корреляционная зависимость.

Методы определения остеокальцина разработаны на основе моно- или поликлональных антител, обладают перекрестной активностью, и в этом отношении дифференцированный анализ интактного пептида или его фрагментов пока затруднен, что ограничивает его использование как маркера остеосинтеза в клинической практике.

Проколлагеновые пропептиды. Коллаген I типа синтезируется остеобластами в виде проколлагена I типа, который содержит дополнительные последовательности на обоих концах молекул-предшественников (PINP и PICP), характеристика которых представлена в табл. 1. Процессу формирования коллагеновых фибрилл предшествует отщепление концевых пропептидов под воздействием специфических протеаз, которые затем поступают в циркуляторное русло в количествах, эквивалентных коллагену, включаемому на последующих этапах костеобразования в костный матрикс. Проколлагеновые пропептиды идентифицированы более 30 лет назад с последующим выделением специ-

фических моноклональных антител к ним, что сделало доступным их определение при использовании ИФА или РИА. Выраженная физиологическая вариабельность ограничивает применение PISР в клинической практике в качестве критерия интенсивности синтеза коллагена I типа.

Маркеры резорбции костной ткани

Гидроксипролин — незаменимая аминокислота, которая входит в состав коллагена разных типов. Ее высокое содержание (около 13 %) обеспечивает в определенной степени стабильность коллагеновых фибрилл. В процессе деградации коллагена гидроксипролин поступает в кровь в виде свободной формы, на долю которой приходится около 90 % от общего гидроксипролина, а также в связанной с поли- и олигопептидами форме. Из-за низкой молекулярной массы свободный гидроксипролин фильтруется с мочой, затем практически полностью (90 %) реабсорбируется в почечных канальцах и в последующем метаболизируется в печени, тогда как пептид-связанные формы и не абсорбированный свободный гидроксипролин (10 %) экскретируются с мочой.

До последнего времени гидроксипролин мочи наряду с другими биохимическими показателями использовали в клинической практике в качестве критерия резорбции костной ткани. Между тем иммуногистохимические исследования костной ткани подтвердили отсутствие корреляции между экскрецией гидроксипролина и объективными признаками костной резорбции. Низкая специфичность гидроксипролина в связи с его распространенностью практически во всех типах соединительной ткани, а также способностью реутилизироваться в процессе синтеза коллагена обусловили поиск более специфичных маркеров резорбции костной ткани.

Пиридиновые связи коллагена. При исследовании структуры коллагена показано, что стабильность коллагенового матрикса обеспечивают межмолекулярные необратимые связи, образующиеся между незаменимыми аминокислотами (лизином и гидроксизизином), входящими в полипептидную цепь коллагена I типа. Перекрестные связи возникают между концевой (представленной N- или C-телопептидом) и спиралевидной частями пептидных молекул коллагена в процессе формирования коллагеновых фибрилл, а их общей особенностью является наличие пиридинового кольца, что обусловило их наименования: PYD и DPD. Последующий анализ показал, что PYD и DPD присутствуют только во внеклеточных коллагеновых фибриллах, характерны для дифференцированного матрикса прочных типов соединительной ткани — кости, дентина, сухожилий, хряща и не обнаруживаются в коллагене кожи, мягких тканях, чем выгодно отличаются от гидроксипролина.

Костная ткань — основной источник PYD биологических жидкостей организма. В количественном

отношении PYD как межмолекулярная связь коллагеновых молекул преобладает в хрящевой ткани, сухожилиях, связках, однако активный метаболизм костной ткани по сравнению с другими типами соединительной ткани давал многим исследователям основание считать, что определяемый в моче PYD образуется преимущественно за счет костной деструкции физиологического или патологического характера [39].

DPD более специфичен для костной ткани, поскольку обнаруживается практически исключительно в костях. Соотношение PYD: DPD, которое в коллагене костной ткани составляет 4:1, сохраняется в моче взрослых, в которой на долю DPD приходится около 20 % от общего уровня экскреции пиридиновых связей коллагена, что является еще одним доказательством специфичности обоих пиридиновых аналогов для костной ткани [40].

PYD и DPD — стабильные структуры, не подверженные деградации в процессе резорбции коллагена костного матрикса. Они поступают в циркуляторное русло в составе пептидных фрагментов и практически полностью экскретируются с мочой в виде свободной (40 %), а также связанной с пептидами или гликозилированной (60 %) форм. В отличие от гидроксипролина, который может реутилизироваться в процессе синтеза коллагена, PYD и DPD не метаболизируются в печени и не вовлекаются в эти процессы, что обеспечивает их высокую специфичность и чувствительность как критериев костной резорбции.

В количественном отношении PYD и DPD — минорные компоненты коллагена I типа, поэтому их идентификация стала возможной только благодаря природной флуоресценции пиридина, входящего в состав обоих аналогов. Измерение флуоресценции с методической точки зрения характеризуется высокой чувствительностью, а важнейшим из методов уже более 20 лет остается ЖХВР. Одним из преимуществ метода является то, что ЖХВР дает возможность определять как свободные, так и гликозилированные и пептид-связанные фракции PYD и DPD, что соответствует их общей экскреции, наиболее полно отражающей костную резорбцию [41]. Возможно определение PYD и DPD на основе ИФА [41].

При изучении закономерностей экскреции PYD и DPD обнаружена ее возрастная зависимость. Период роста и увеличения костной массы у детей характеризуется значительным усилением и вариабельностью экскреции PYD и DPD, которая постепенно снижается до уровня среднестатистической нормы при достижении индивидуального пика костной массы к 30 годам [42]. Наблюдали тенденцию к повышению уровней PYD и DPD в моче после 50–60 лет как у мужчин, так и у женщин, у последних она выражена сильнее. Существует индивидуальная и суточная вариабельность экскреции PYD и DPD, выражающаяся, в частности, в ее снижении в ночные и усилении в утренние часы, однако при исследовании порционной и 24-часовой

мочи установлена высокая корреляционная зависимость результатов при их пересчете на концентрацию креатинина мочи [43]. Снижение вариабельности достигается при стандартизации режима сбора и анализа мочи, в частности при исследовании второй утренней порции мочи (от 8 до 10 ч), а также при нормализации измеренных уровней PYD и DPD по отношению к концентрации креатинина анализируемой порции мочи.

Коллагеновые пептиды. Наряду с PYD и DPD в составе фрагментов коллагена, экскретирующихся с мочой в виде продуктов деградации костного матрикса, идентифицированы также пептидные компоненты, которые привлекли внимание исследователей как потенциальные критерии костной резорбции.

В табл. 1 представлена информация о CTX и NTX, которые можно обнаруживать в моче как независимо, так и в комплексе с PYD или DPD, что не влияет на их детекцию. К обоим типам тепопептидов выделены поли- и моноклональные антитела, на основе которых разработаны тест-системы, и стало возможным определение С-концевого тепопептида в сыворотке крови (ICTP, CTX) и моче (CTX, Cross Laps) [44] и N-тепопептида (NTX, NTP) в моче [45].

ТРКФ (КФ 3.1.3.2) относится к гидролазам, проявляющим свои свойства по отношению к фосфомоноэфирам ортофосфата в кислой среде. Фермент гетерогенен по составу и представлен шестью различающимися по своей структуре изоформами, две из которых продуцируются остеокластами. В соответствии с особенностями внутриклеточного распределения изофермент с большей молекулярной массой (100 кДа) локализуется в лизосомах, тогда как изоформа с молекулярной массой 34 кДа — в гофрированной каемке остеокластов. Этот изофермент отличается от других изоформ устойчивостью к ингибирующему действию тартрата (см. табл. 1).

В процессе костной резорбции ТРКФ выделяется из гофрированной каемки остеокластов в резорбционную полость, где проявляет свои гидролитические свойства. В связи с этим представлялось, что высокая активность ТРКФ в сыворотке крови должна отражать усиление интенсивности резорбции костной ткани. Однако в связи со сложностью молекулярных механизмов костного ремоделирования ТРКФ регулируется различными факторами, в частности, ПТГ стимулирует, а кальцитонин ингибирует продукцию фермента остеокластами. Требуется также специфические условия для проявления ферментативной активности, регуляция которых сложна. Кроме того, существуют методические проблемы, затрудняющие определение ТРКФ (в частности нестабильность фермента и присутствие в сыворотке крови его ингибиторов). После разработки тест-систем на основе ИФА появилась возможность определения ТРКФ в сыворотке крови, однако однозначных данных по клиническому использованию данного фермента как критерия резорбции костной ткани не представлено.

Клиническое значение биохимических маркеров костной резорбции при заболеваниях скелета различной этиологии

PYD и DPD — наиболее информативные маркеры костной резорбции, а первые результаты исследования PYD в качестве критерия костной резорбции опубликованы S. P. Robins et al. в 1986 г. [39]. В серии последующих клинических работ представлены данные о возможном их использовании в диагностике и мониторинге заболеваний скелета метаболического характера [40]. Повышенные уровни PYD и DPD в моче по сравнению с их экскрецией в норме обнаружены при гиперпаратиреозе, остеомалиции и остеопорозе, болезни Педжета.

В последние годы опубликованы результаты кооперированных исследований, свидетельствующие об усилении экскреции PYD и DPD с возрастом, наиболее выраженном у женщин в постменопаузе, что связывают с дефицитом половых гормонов [41]. Потеря костной массы в норме составляет у женщин 0,75–2,4 %, у мужчин — 0,4–1,2 % в год. Пожилой возраст и женский пол являются факторами риска возникновения остеопороза, поскольку у женщин пиковая костная масса на 30–50 % ниже, чем у мужчин, а ежегодная скорость ее потери выше [46].

При исследованиях маркеров костной резорбции у больных остеопорозом установлена зависимость уровней PYD и DPD от степени снижения минеральной плотности костной ткани (МПКТ) при ее измерении на основе двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии. Представлены убедительные доказательства возможности использования PYD и DPD мочи в качестве маркеров эффективности лечения остеопороза, основанные на достоверном снижении их уровней при положительном эффекте гормональной заместительной терапии и лечении бисфосфонатами [40, 43].

Ранее предпринимались попытки использования показателей экскреции общего и ионизированного кальция с одновременным определением кальция сыворотки крови и гидроксипролина мочи в целях диагностики и оценки эффективности лечения костных метастазов, однако практического применения эти биохимические показатели не получили.

Первые клинические исследования PYD и DPD в качестве маркеров костного метастазирования опубликованы до 1993 г., в них высказано предположение о возможном использовании этих показателей в мониторинге поражения скелета у онкологических больных. Авторы выявили достоверное увеличение общей экскреции PYD и DPD у больных раком простаты и РМЖ с поражением скелета по сравнению с больными без клинических признаков костных метастазов и контролем. Этот факт позволил исследователям сделать вывод об усилении костной резорбции при бластическом характере поражения скелета.

По данным J. J. Body et al., усиление общей экскреции PYD и DPD наблюдали у всех обследованных

больных РМЖ с метастазами в костях по сравнению с практически здоровыми женщинами [47]. В то же время увеличение в моче таких показателей, как кальций, гидроксипролин, СТХ, обнаруживали не у всех пациенток (соответственно в 47, 74 и 83 % наблюдений).

Для оценки значимости PYD и DPD в качестве маркеров костных метастазов при различном характере поражения скелета нами предпринято исследование их экскреции при использовании ЖХВР и ИФА у 271 онкологического больного с метастазами в костях, из них 180 больных РМЖ, 41 — раком простаты, 21 — раком легкого и 29 — множественной миеломой, а также 94 онкологических больных без клинических признаков поражения скелета.

Суммируя полученные данные [48, 49], следует отметить одинаковую направленность выявленных изменений при первичных опухолях различной локализации. Общая экскреция с мочой PYD и DPD была существенно (более чем в 2,5 раза) повышена у больных с метастазами в костях при РМЖ, раке легкого, простаты, а также при множественной миеломе по сравнению с нормой и онкологическими больными без клинических признаков костных метастазов. С наибольшей частотой повышенные по отношению к верхней границе нормы значения PYD и DPD обнаруживались при раке легкого (92,3 % для обоих маркеров), РМЖ (95,5 и 73,6 % соответственно) и множественной миеломе (100 и 54,6 % соответственно), при которых поражение костей имеет, как известно, преимущественно литический характер. Больные раком простаты имели повышенные уровни PYD и DPD в 75,6 и 65,9 % наблюдений соответственно. Полученные данные представляют особый интерес с точки зрения общепринятого в клинической практике деления костных метастазов на литические и бластические в соответствии с типом первичной опухоли и свидетельствуют о наличии выраженной резорбции костной ткани у онкологических больных с метастазами в костях независимо от локализации злокачественного процесса.

Следует отметить, что результаты определения PYD и DPD в моче онкологических больных без метастатического поражения скелета весьма противоречивы. Так, некоторые авторы отмечают отсутствие достоверных различий в их экскреции у онкологических больных без метастазов в кости и практически здоровых людей [50]. В то же время в ряде работ обнаружено достоверное усиление экскреции PYD и DPD по сравнению с нормой не только при метастазах в костях, но и у больных без признаков метастатического поражения скелета [51, 52]. При этом в качестве одного из предполагаемых механизмов усиления экскреции пиридиновых связей коллагена у больных без метастазов в костях авторы рассматривают стимуляцию костной резорбции в результате локального или системного воздействия факторов, продуцируемых некоторыми

типами злокачественных опухолей. Однако необходимо учитывать тот факт, что, несмотря на отсутствие клинических признаков метастазов, поражение скелета у таких больных исключить нельзя в связи с существующими трудностями ранней диагностики метастазирования в кости при использовании инструментальных методов.

В выполненном нами исследовании подтверждением этого предположения были больные раком легкого, простаты и РМЖ (15 %), у которых первыми признаками поражения скелета были высокие уровни PYD и DPD, опережавшие данные рентгенографии на 6–12 мес, что позволяет рассматривать эти показатели в качестве ранних биохимических критериев костных метастазов.

В настоящее время имеется значительная теоретическая и методическая база для разработки и испытания новых подходов в лечении и профилактике костных метастазов, что требует внедрения в клиническую практику неинвазивных чувствительных критериев костного метаболизма, позволяющих оценивать состояние скелета и эффективность терапии. Так, анализ результатов серийного исследования PYD и DPD в моче больных РМЖ с метастазами в костях, получавших лечение памидронатом, показал возможность использования этих показателей для оценки эффективности лечения бисфосфонатами, поскольку уже через 7 дней после первого введения препарата наблюдали снижение экскреции обоих аналогов [47]. Снижение экскреции PYD и DPD положительно коррелировало с эффективным лечением, в отличие от гидроксипролина в моче и кальция в сыворотке крови, и наблюдалось в довольно ранние сроки, отражая уменьшение интенсивности костной резорбции [53]. Возможность применения экскреции PYD и DPD для наблюдения за эффективностью лечения подтверждена нами у больных РМЖ с метастазами в костях, получавших ибандронат. Для больных с положительным эффектом лечения характерно снижение уровней PYD и DPD в моче на 44–64 % уже через 3–6 мес от начала терапии. При отрицательной динамике, выражавшейся в появлении новых метастазов и отсутствии данных за репарацию остеолитических очагов, продолжалось повышение экскреции пиридиновых связей коллагена [48].

Среди других современных маркеров костного ремоделирования большое внимание исследователей привлекают СТХ и NTX, экскретирующиеся, так же как PYD и DPD, в составе коллагеновых фрагментов при деструкции костного матрикса [2]. В большинстве работ продемонстрирована прямая корреляция результатов определения PYD и DPD с телопептидами по данным ИФА [50]. При этом PYD и DPD проявляли большую чувствительность и специфичность как в диагностике, так и в оценке эффективности лечения метастазов. Позже появились публикации, которые продемонстрировали возможность применения маркеров костной резорбции (ТРКФ, DPD, СТХ, NTX) не только в диагностике, но и в мониторинге пораже-

ния скелета [47, 54, 55]. При этом во многих наблюдениях авторы высказали мнение, что СТХ характеризуется большей чувствительностью по сравнению с НТХ как маркер диагностики и мониторинга костного метастазирования.

Нами выполнено сравнительное исследование СТХ на основе данных ИФА в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях и без поражения скелета, а также практически здоровых женщин. В контрольной группе максимальные значения СТХ достигали 0,76 нг/мл и соответствовали общепринятой норме данного маркера костной резорбции ($< 0,8$ нг/мл) (табл. 2). У большинства женщин этой группы — 42 (89,4 %) из 47 — преобладали значения показателя в интервале до 0,6 нг/мл. У 5 (10,6 %) из 47 женщин значения СТХ были несколько выше (0,6–0,76 нг/мл), что можно связать с постменопаузой от 3 до 5 лет у этих женщин. По результатам определения СТХ в сыворотке крови практически здоровых женщин рассчитано пороговое значение маркера, равное 0,74 нг/мл, соответствующее 95 % доверительному интервалу.

Таблица 2. Уровни СТХ в сыворотке крови больных РМЖ и практически здоровых женщин

Группы	Число женщин	Уровень СТХ (нг/мл)	
		медиана (квартили)	среднее $\pm$ SD (интервалы)
Контрольная ¹	47	0,34 (0,22–0,44)	0,33 $\pm$ 0,15 (0,01–0,76)
Больные РМЖ без метастазов в костях ²	167	0,41 (0,27–0,52)	0,43 $\pm$ 0,21 (0,11–1,13)
Больные РМЖ с метастазами в костях ³	71	0,92 (0,65–1,31)	1,12 $\pm$ 0,72 (0,21–3,52)

Примечание. $p_{1-2} = 0,004$; $p_{1-3} = 0,000001$; $p_{2-3} = 0,000001$.

Результаты определения СТХ в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях при первичном обследовании выявили высокодостоверное ($p = 0,000001$) повышение как медиан (0,92 и 0,41 нг/мл), так и средних уровней (1,12 и 0,43 нг/мл) маркера остеолита по сравнению с больными без метастазов (см. табл. 2). При этом для больных анализируемых групп максимальные уровни СТХ существенно превышали показатель нормы [56].

В последнее время усилился интерес к прогностической значимости пептидных фрагментов коллагена I типа (ICTP) как маркеров остеолита при поражении скелета злокачественными опухолями. Так, при исследовании ICTP в сыворотке крови 40 больных раком простаты с поражением скелета наиболее выраженное увеличение телопептида обнаружили у 17 больных со смешанными метастазами в костях с худшим прогнозом по сравнению с 23 больными

с бластическими метастазами, у которых отмечена лучшая выживаемость [57].

Установлена корреляция между исходными уровнями НТХ и развитием скелетных осложнений у онкологических больных [58], а высокие уровни НТХ ассоциированы с неблагоприятным прогнозом и короткой выживаемостью [59].

Показано, что уровень СТХ в моче отражает интенсивность остеолита и определяет прогноз у больных РМЖ с метастазами в костях [60]. Нами проанализирована взаимосвязь результатов определения СТХ в сыворотке крови больных РМЖ с клиническими проявлениями метастазов в костях (табл. 3). Установлено статистически достоверное увеличение уровней сывороточного СТХ у больных при множественных метастазах по сравнению с единичными очагами поражения. Наличие патологического перелома — важная клиническая характеристика выраженности остеолита у больных РМЖ при поражении скелета. Полученные нами данные по исследованию СТХ выявили высокодостоверное повышение уровня маркера в крови больных с патологическим переломом по сравнению с соответствующим показателем при его отсутствии. Обнаружено достоверное увеличение маркера в группах пациенток с сильной болью, получавших наркотические анальгетики, по сравнению с пациентками с умеренной болью, принимавшими нестероидные противовоспалительные соединения.

Таблица 3. Уровни СТХ у больных РМЖ в зависимости от клинических характеристик метастатического процесса

Критерий	Медиана (квартили)	Среднее ± SD (интервал)	<i>p</i>
<i>Распространенность поражения скелета</i>			
Множественные метастазы	1,29 (1,01–1,86)	1,5 ± 0,79 (0,67–3,52)	0,00001
Единичные метастазы	0,64 (0,54–0,75)	0,66 ± 0,2 (0,21–1,17)	
<i>Патологический перелом</i>			
Наличие	1,24 (0,92–1,6)	1,46 ± 0,79 (0,67–3,52)	0,0001
Отсутствие	0,63 (0,54-0,71)	0,67 ± 0,21 (0,21–1,17)	
<i>Болевой синдром</i>			
Сильный	1,3 (1,01–1,87)	1,54 ± 0,8 (0,69–3,52)	0,00002
Умеренный	0,65 (0,54–0,76)	0,69 ± 0,25 (0,21–1,58)	

Оценку прогностического значения СТХ проводили с учетом порогового уровня маркера, соответствующего 95 % доверительному интервалу, рассчитанного

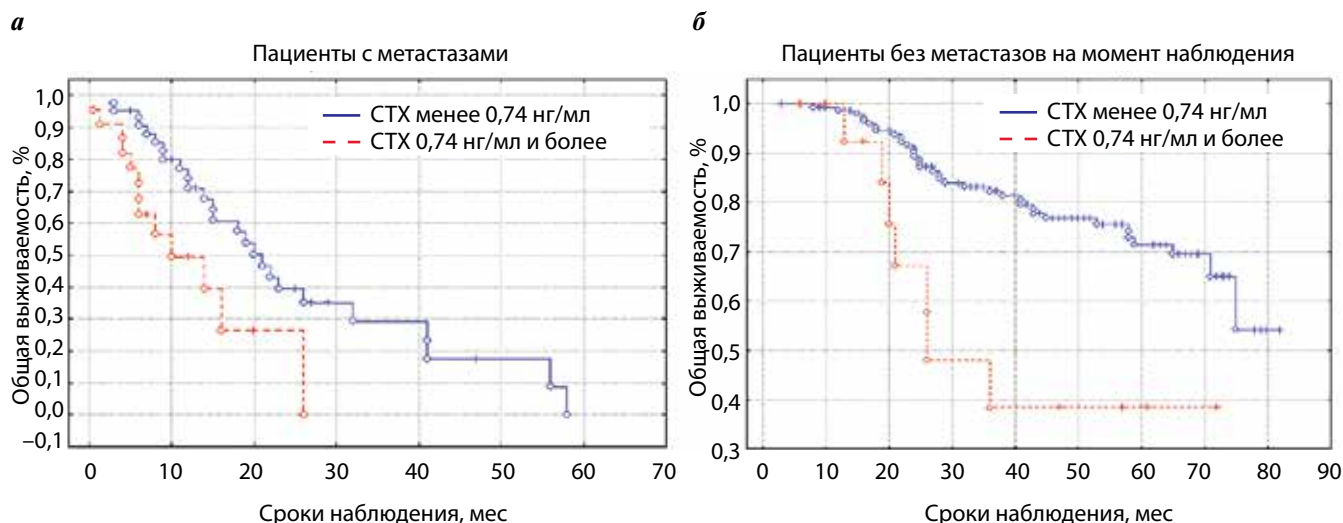


Рис. 1. Общая выживаемость больных РМЖ с метастазами в костях (а) и без исходных метастазов (б) в зависимости от уровня СТХ

танному по результатам определения показателей в контрольной группе. Анализ общей выживаемости проведен в 3 группах больных: 1) группа больных с исходными метастазами в костях и постоянным противоопухолевым лечением; 2) группа больных без поражения скелета; 3) группа больных с развившимися в процессе 6-летнего наблюдения метастазами, не получавших до обследования противоопухолевой терапии. В соответствии с кривыми выживаемости, при значениях СТХ выше порогового уровня (0,74 нг/мл) в сыворотке крови больных РМЖ с метастазами в костях 3-летняя общая выживаемость была нулевой, тогда как в подгруппе пациенток с низкими показателями она составила 30 % (рис. 1а; $p < 0,05$). При этом медиана общей выживаемости при повышенных уровнях СТХ, отражающих усиленный остеолит, была достоверно ниже по сравнению с группой больных с нормальным уровнем маркера (11,9 и 21,7 мес соответственно; $p < 0,03$).

Анализ 5-летней общей выживаемости больных РМЖ без признаков поражения скелета выявил ее зависимость от уровня СТХ как при первичном определении, так и в процессе динамического наблюдения. При значениях СТХ выше порогового уровня 5-летняя выживаемость составила 28,5 %, тогда как при показателях $< 0,74$ нг/мл она была достоверно выше (71,5 %; $p = 0,015$) (рис. 1б).

Проанализирована выживаемость в подгруппе больных РМЖ с развившимися в период наблюдения костными метастазами, у которых в большинстве случаев уровни маркеров были повышены. При этом оценка общей выживаемости в этой группе больных проведена с учетом результатов определения СТХ в ближайшие сроки до выявления метастазов. Пятилетняя общая выживаемость пациенток с высокими уровнями СТХ была нулевой, тогда как при нормальных значениях показателя она составила 55,5 % (рис. 2; $p < 0,05$). При этом медиана выживаемости

пациенток с повышенными уровнями СТХ, отражающими усиленный остеолит, была достоверно ниже, чем у больных с нормальным уровнем маркера (20,5 и 40,1 мес соответственно; $p < 0,05$).

Многофакторный анализ, включавший основные клинико-морфологические характеристики РМЖ и уровни биохимических показателей костного метаболизма, доказал, что СТХ является независимым фактором прогноза развития костных метастазов наряду с таким фактором, как степень злокачественности опухоли.

Клиническое значение биохимических маркеров остеосинтеза

Показатели ЩФ коррелируют с активностью остеобластов, что способствовало внедрению общей активности ЩФ и ее костной фракции в клиническую практику в целях диагностики и мониторинга заболеваний скелета (см. табл. 1). Однако до настоящего вре-

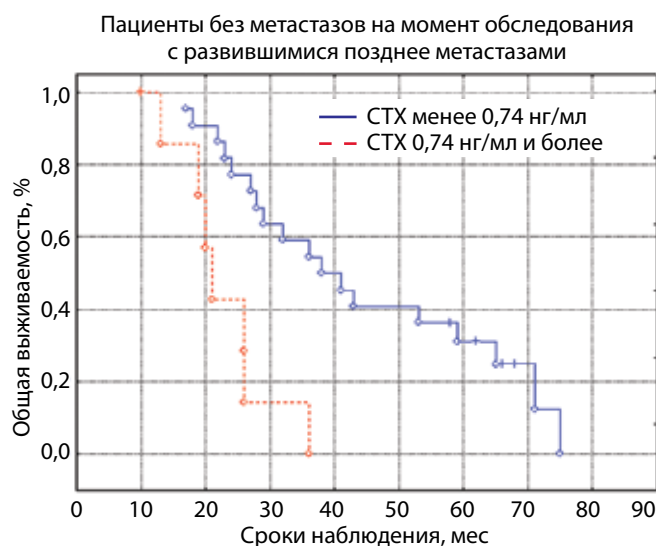


Рис. 2. Общая выживаемость больных РМЖ с развившимися в период наблюдения метастазами в зависимости от уровней СТХ

мени исследователи не пришли к единому мнению по поводу значения других биохимических показателей, участвующих в процессах формирования костной ткани, в качестве маркеров костных метастазов. В единичных работах продемонстрирована прямая корреляция результатов определения общей активности ЩФ, КЩФ, остеокальцина и СТХ [53, 61], хотя КЩФ проявляла большую диагностическую чувствительность. В соответствии с данными различных авторов, увеличение концентрации остеокальцина и РИСР в сыворотке крови онкологических больных с метастазами в костях по сравнению с активностью КЩФ, как правило, выражено в значительно меньшей степени.

Оказалось, что активность КЩФ повышается у больных раком простаты с метастазами в костях, ее увеличение было максимальным по степени (1,5–5 раз) и частоте (68–80 %) [61, 62]. При РМЖ степень увеличения активности фермента была несколько ниже (1,2–2,5 раза), а частота соответствовала 53–68 % [47, 61, 63]. Следует отметить, что при сравнительном анализе результатов определения общей и специфической активности фермента у онкологических больных с костными метастазами и без таковых большинство авторов отмечают значительно более высокие уровни ЩФ при метастатическом поражении скелета [50, 61, 63], а также указывают на отсутствие достоверных различий между группой больных без признаков поражения скелета и контролем [61, 64]. Однако, по данным некоторых авторов, активность ЩФ и КЩФ у онкологических больных без костной деструкции достоверно повышена по отношению к соответствующим нормальным значениям маркера [52, 63].

Согласно нашим данным, полученным при определении общей активности ЩФ в сыворотке крови 271 онкологического больного с поражением скелета, наибольшая гиперферментемия отмечена у больных раком простаты (1092 ± 191 Ед/л), и она достоверно превышала соответствующие показатели при РМЖ (407 ± 28 Ед/л) и раке легкого (517 ± 124 Ед/л) [48]. Во всех группах больных с поражением скелета, за исключением больных множественной миеломой, у которых средний уровень фермента оставался в норме, активность ЩФ достоверно превышала показатель контрольной группы (250 Ед/л). С наибольшей частотой гиперферментемия выявлялась при раке простаты (80,5 %), при этом более чем у 50 % больных обнаружено резкое (от 2 до 21,5 раза) увеличение ЩФ. При РМЖ и раке легкого гиперферментемия выявлена в 58 и 76 % наблюдений, в основном она носила умеренный характер. Для КЩФ закономерности были аналогичные, что позволяет нам рассматривать данный фермент как самостоятельный диагностический критерий костных метастазов при раке простаты.

Активность КЩФ у больных РМЖ с множественными метастазами в костях достоверно превышала таковую у пациентов с единичными метастазами, при

патологическом переломе и выраженном болевом синдроме (табл. 4).

Таблица 4. Активность КЩФ у больных РМЖ в зависимости от клинических характеристик метастатического процесса

Критерий	КЩФ (Ед/л)	p
Распространенность поражения скелета		
Множественные метастазы	33,1 (5,4—80,5)	0,02
Единичные метастазы	0,64 (0,54—0,75)	
Патологический перелом		
Наличие	54,5 (9,5—160,6)	0,005
Отсутствие	29,8 (11,8—93,2)	
Болевой синдром		
Сильный	59,8 (11,8—185,3)	0,01
Умеренный	34,6 (9,5—160,6)	

У больных РМЖ с костными метастазами выявлены достоверные различия в зависимости от уровня КЩФ по показателю 3-летней общей выживаемости, который был нулевым при гиперферментемии ($> 43,7$ Ед/л), тогда как при благоприятных (ниже порогового уровня) значениях фермента она составила 39,1 % (рис. 3а). В группе без исходных метастазов также установлены достоверные различия ($p = 0,015$) с учетом порогового уровня КЩФ (43,7 Ед/л): 5-летняя выживаемость была существенно ниже (23,8 %) при гиперферментемии, тогда как при нормальных значениях маркера она достигала 72,2 % (рис. 3б).

Кроме того, выявлены достоверные различия медианы общей выживаемости пациенток обеих групп. При этом медиана общей выживаемости пациенток с исходными метастазами при показателях КЩФ в пределах нормы составила 24,2 мес, достоверно ($p = 0,011$) превышая таковую при гиперферментемии (13,4 мес). Медиана выживаемости у пациенток без метастатического поражения скелета в подгруппе с нормальными показателями не была достигнута, тогда как при повышенных значениях КЩФ по отношению к пороговому уровню соответствовала 27 мес.

Заключение

Таким образом, оценка состояния костного ремоделирования на основе исследования СТХ и КЩФ в сыворотке крови больных РМЖ имеет прогностическое значение не только в отношении дальнейшего клинического течения болезни, но и в отношении прогноза жизни. Проведенный многофакторный анализ установил прогностическую значимость СТХ и КЩФ наряду с важными клинико-морфологическими характеристиками РМЖ. Полученные результаты с учетом наибольшей значимости СТХ послужили основанием для включения показателя остеолита в ал-

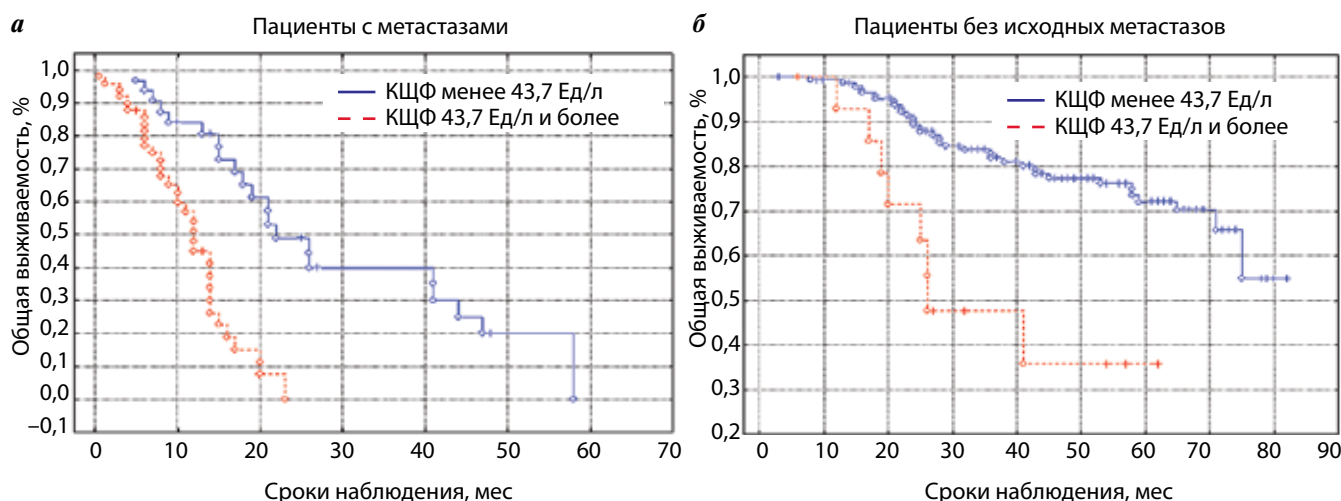


Рис. 3. Общая выживаемость больных РМЖ с метастазами в костях (а) и без исходных метастазов (б) в зависимости от уровней КЩФ

горитм обследования больных РМЖ с целью повышения точности диагностики ранних костных метастазов, оценки прогноза и оптимизации тактики применения бисфосфонатов.

Интерес к биохимическим маркерам костного ремоделирования как неинвазивным методам обследования онкологических больных усиливается по мере внедрения в клиническую практику современных лабораторных технологий. Работы последних лет свидетельствуют о возможности их применения не только в целях мониторинга и прогноза, но и для проведения ранней диагностики метастазов в костях [65].

Выполненный К. Jung и М. Lein метаанализ результатов определения маркеров костного метаболизма у пациентов с различными локализациями опухолей (рак легкого, почки, простаты, РМЖ) свидетельствует о необходимости разработки количественных критериев для каждого из маркеров (NTX, CTX, ICTP, DKK, PYD, DPD, КЩФ) с учетом их специфичности, а также особенностей костной деструкции [66]. Стандартизация исследования биохимических маркеров костного ремоделирования необходима для оптимизации обследования онкологических больных с опухолями повышенной остеотропности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Под ред. М. И. Давыдова, Е. М. Аксель. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с. [Statistics of malignant tumours in Russia and CIS countries in 2012. under the editorship of M. I. Davydova, E. M. Aksel. Moscow: Publishing Group of Russian Cancer Research Center, 2014. Pp. 226. (In Russ.)].
2. Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е. Маркеры костного ремоделирования: общие представления и клиническое значение при поражении скелета у онкологических больных. Вопросы онкологии 2001;47(1):18–23. [Lyubimova N. V., Kushlinsky N. E. Bone turnover markers: fundamental understanding and clinical relevance at skeletal lesion in oncologic patients. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2001;47(1):18–23. (In Russ.)].
3. Кушлинский Н. Е., Тимофеев Ю. С. Роль системы RANK/RANKL/OPG в патогенезе первичных и метастатических опухолей костей. Патогенез 2013;11(4):9–15. [Kushlinsky N. E., Timofeev Y. S. Role of RANK/RANKL/OPG system in pathogenesis of primary and metastatic bone tumours. Patogenez = Pathogenesis 2013;11(4):9–15. (In Russ.)].
4. Кушлинский Н. Е., Тимофеев Ю. С., Герштейн Е. С., Соловьев Ю. Н. Клинические перспективы исследования компонентов системы RANK/RANKL/OPG при первичных и метастатических опухолях костей. Вопросы онкологии 2014;60(4):413–21. [Kushlinsky N. E., Timofeev Y. S., Gershteyn E. S., Solovyev Y. N. Clinical prospects of system RANK/RANKL/OPG components research at primary and metastatic bone tumours. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2014;60(4):413–21. (In Russ.)].
5. Lee J. A., Jung J. S., Kim D. H. et al. RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. Pediatr Blood Cancer 2011;56(5):738–43.
6. Roodman D. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 2004;350(16):1655–64.
7. Chu G. C., Chung L. W. RANK-mediated signaling network and cancer metastasis. Cancer Metastasis Rev 2014;33(2–3):497–509.
8. Schramek D., Leibbrandt A., Sigl V. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. Nature 2010;468(7320):98–102.
9. Martin T. J. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. World J Orthop 2013;4(4):186–97.
10. Morony S., Capparelli C., Sarosi I. et al. Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumor burden in syngeneic and nude mouse models of experimental bone metastasis. Cancer Res 2001;61(11):4432–6.
11. Choi H. K., Kang H. R., Jung E. et al. Early estrogen-induced gene 1, a novel RANK signaling component, is essential for osteoclastogenesis. Cell Res 2013;23(4):524–36.
12. Rucci N., Millimaggi D., Mari M. et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. Cancer Res 2010;70(15):6150–60.
13. Coleman R. E., Major P., Lipton A. et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with

- bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *J Clin Oncol* 2005;23(22):4925–35.
14. Body J. J., Greipp P., Coleman R. E. et al. A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer* 2003;97(3 Suppl):887–92.
 15. ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): NIH. Single ascending-dose study to characterize the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of CEP-37251 in healthy postmenopausal women. 2010. Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01159873>.
 16. Riggs B. L., Khosla S., Atkinson E. J. et al. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. *Osteoporos Int* 2003;14(9):728–33.
 17. Fizazi K., Lipton A., Mariette X. et al. Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J Clin Oncol* 2009;27(10):1564–71.
 18. Кушлинский Н. Е., Тимофеев Ю. С., Соловьев Ю. Н. и др. Компоненты системы RANK/RANKL/OPG, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-16, ММП-2 и кальцитонин в сыворотке крови больных с новообразованиями костей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2014;157(4):522–6. [Kushlinsky N. E., Timofeev Y. S., Solov'yev Y. N. et al. Components of system RANK/RANKL/OPG, IL-6, IL-8, IL-16, MMP-2 and calcitonin in blood serum of bone tumors patients. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2014;157(4):522–6. (In Russ.)].
 19. Wozney J. M. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(16 Suppl 1):2–8.
 20. Hofbauer L. C., Rachner T., Singh S. K. Fatal attraction: why breast cancer cells home to bone. *Breast Cancer Res* 2008;10(1):101.
 21. Roodman D. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(15):3562–71.
 22. Sezer O., Heider U., Zavrski I. et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003;101(6):2094–8.
 23. Pearce R. N., Sordillo E. M., Yaccoby S. et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to stimulate bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(20):11581–6.
 24. Choi S. J., Cruz J. C., Craig F. et al. Macrophage inflammatory protein 1- α is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood* 2000;96(2):671–5.
 25. Min H., Morony S., Sarosi I. et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000;192(4):463–74.
 26. Choi S. J., Oba Y., Gazitt Y. et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1- α blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. *J Clin Invest* 2001;108(12):1833–41.
 27. Tian E., Zhan F., Walker R. et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349(26):2483–94.
 28. Fujita K., Janz S. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 2007;6:71.
 29. Hameed A., Brady J. J., Dowling P. et al. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management. *Cancer Growth Metastasis* 2014;7:33–42.
 30. Li X., Liu Y., Wu B. et al. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. *Oncol Rep* 2014;32(6):2605–11.
 31. Yamabuki T., Takano A., Hayama S. et al. Dkkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2007;67(6):2517–25.
 32. Mundy G. R., Boyce B. F., Yoneda T. Mechanisms of osteolytic bone destruction. In: *Metastatic Bone Disease: Fundamental and Clinical Aspects*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1994. Pp. 86–92.
 33. Ratcliffe W. A., Bowden S. J. Parathyroid hormone-related protein: Assay and their clinical applications. In: *Calcium Regulating Hormones and Markers of Bone Metabolism: Measurement and Interpretation*. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 71–8.
 34. Моисеенко В. М., Семглазов В. Ф., Тюляндин С. А. Современное лекарственное лечение местнораспространенного и метастатического рака молочной железы. СПб.: Грифон, 1997. 248 с. [Moiseenko V. M., Semiglazov V. F., Tyulyandin S. A. Modern medical therapy of locally advanced and metastatic breast cancer. St. Petersburg: Grifon, 1997. 248 p. (In Russ.)].
 35. Moss D. W. Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. *Clin Biochem* 1987;20(4):225–30.
 36. Kress B. C. Bone alkaline phosphatase in normal and disease processes. In: *Calcium regulating hormones and markers of bone metabolism: measurement and interpretation*. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 171–82.
 37. Van Straalen J. P., Sanders E., Prummel M. F., Sanders G. T. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 1991;201(1–2):27–33.
 38. Price C. P., Thompson P. W. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):244–60.
 39. Robins S. P., Stewart P., Astbury C., Bird H. A. Measurement of the crosslinking compound, pyridinoline, in urine as an index of collagen degradation in joint diseases. *Ann Rheum Dis* 1986;45(12):969–73.
 40. Robins S. P., Black D., Paterson C. R. et al. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *Eur J Clin Invest* 1991;21(1):310–5.
 41. Becker S., Traber L., Schmidt-Gayk H. Free and peptide-bound pyridinium crosslinks in urine measured in healthy people, women after menopause and patients with bone metastases. In: *Calcium regulating hormones and markers of bone metabolism: measurement and interpretation*. Heidelberg: Clin. Lab. Publications, 1997. Pp. 141–6.
 42. Delmas P. D. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995;266:176–82.
 43. Bonde M., Qvist P., Fledelius C. et al. Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): Follow-up on hormone re-placement therapy and osteoporosis risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(3):864–8.
 44. Hanson D. A., Weis M. A., Bollen A. M. et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992;7(11):1251–8.
 45. Рожинская Л. Я. Остеопороз: диагностика нарушений метаболизма костной ткани и кальций-фосфорного обмена. Клиническая и лабораторная диагностика 1998;(5):25–32. [Rozhinskaya L. Y. Osteoporosis: diagnostics of bone tissue metabolism and calcium-phosphoric metabolism disturbances. *Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika* = Clinical and Laboratory Diagnostics 1998;(5):25–32. (In Russ.)].
 46. Body J. J., Dumon J. C., Gineys E., Delmas P. D. Comparative evaluation of markers of bone resorption in patients with breast cancer-induced osteolysis before and after bisphosphonate therapy. *Br J Cancer* 1997;75(3):408–12.
 47. Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е., Робинс С. П. Маркеры резорбции костной ткани при метастатическом поражении скелета. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1998;(3):323–8. [Lyubimova N. V., Kushlinsky N. E., Robins S. P. Bone resorption markers at metastatic bone disease. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1998;(3):323–8. (In Russ.)].
 48. Любимова Н. В., Никитина О. Ю., Робинс С. П., Кушлинский Н. Е. Биохимические маркеры костного

- ремоделирования у онкологических больных с поражением скелета. Вопросы онкологии 2000;(5):13–8. [Lyubimova N. V., Nikitina O. Y., Robins S. P., Kushlinsky N. E. Bone turnover biochemical markers in oncologic patients with skeletal lesion. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2000; (5):13–8. (In Russ.)].
49. Withold W., Friedrich W., Reinauer H. Comparison of biochemical markers of bone resorption in patients with metabolic and malignant bone diseases. Ann Clin Biochem 1996;33(Pt 5):421–7.
50. Lipton A., Demers L., Daniloff Y. et al. Increased urinary excretion of pyridinium cross-links in cancer patients. Clin Chem 1993;39(4):614–8.
51. Pecherstorfer M., Zimmer-Roth I., Schilling T. et al. The diagnostic value of urinary pyridinium cross-links of collagen, serum total phosphatase, and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease. J Clin Endocrinol Metab 1995;80(1): 97–103.
52. Seibel M. J., Lambrinoudaki I., Zipf A. Biochemical markers of bone metabolism in metastatic bone disease. In: Metastatic bone disease: fundamental and clinical aspects. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1994. Pp. 109–26.
53. Lumachi F., Santeufemia D. A., Del Conte A. et al. Carboxy-terminal telopeptide (CTX) and amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen as markers of bone metastases in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2013;33(6):2593–6.
54. Addison C. L., Pond G. R., Zhao H. et al. Effects of de-escalated bisphosphonate therapy on bone turnover biomarkers in breast cancer patients with bone metastases. Springerplus 2014;3:577.
55. Любимова Н. В., Кожарская Г. В., Агеева Т. В. и др. Клиническое значение биохимических показателей костного ремоделирования при поражении скелета у больных раком молочной железы. Молекулярная медицина 2012;(5):25–9. [Lyubimova N. V., Kozharskaya G. V., Ageeva T. V. et al. Clinical relevance of bone turnover biochemical indices at skeletal lesion in breast cancer patients. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine 2012;(5):25–9. (In Russ.)].
56. Kylmälä T., Tammela T. L., Risteli L. et al. Type I collagen degradation product (ICTP) gives information about the nature of bone metastases and has prognostic value in prostate cancer. Br J Cancer 1995;71(5):1061–4.
57. Brown J. E., Cook R. J., Major P. et al. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer and other solid tumors. J Natl Cancer Inst 2005;97(1):59–69.
58. Ali S. M., Demers L. M., Leitzel K. et al. Baseline serum NTx levels are prognostic in metastatic breast cancer patients with bone-only metastasis. Ann Oncol 2004;15(3):455–9.
59. Семенов Н. Н., Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е., Личиницер М. Р. С-концевой телопептид коллагена I типа в моче — фактор прогноза при метастатическом поражении скелета у больных раком молочной железы. Технологии живых систем 2012;9(3):3–7. [Semenov N. N., Lyubimova N. V., Kushlinsky N. E., Lichinitser M. R. Beta-cross laps in urine as forecast factor at metastatic skeletal lesion in breast cancer patients. Tekhnologii zhivyykh system = Living Systems Technologies 2012;9(3):3–7. (In Russ.)].
60. Berruti A., Piovesan A., Torta M. et al. Biochemical evaluation of bone turnover in cancer patients with bone metastases. Br J Cancer 1996;73(12):1581–7.
61. Du W. X., Duan S. F., Chen J. J. et al. Serum bone-specific alkaline phosphatase as a biomarker for osseous metastases in patients with malignant carcinomas: a systematic review and meta-analysis. J Cancer Res Ther 2014;10(Suppl 2):140–3.
62. Demers L. M., Costa L., Chinchilli V. M. et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease. Clin Chem 1995;41(10):1489–94.
63. Li F., Pitt P. I., Sherwood R. et al. Biochemical markers of bone turnover in women with surgically treated carcinoma of the breast. Eur J Clin Invest 1993;23(9):566–71.
64. Tang C., Liu Y., Qin H. et al. Clinical significance of serum BAP, TRACP 5b and ICTP as bone metabolic markers for bone metastasis screening in lung cancer patients. Clin Chim Acta 2013;426:102–7.
65. Jung K., Lein M. Bone turnover markers in serum and urine as diagnostic, prognostic and monitoring biomarkers of bone metastasis. Biochim Biophys Acta 2014;1846(2):425–38.

Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам топоизомераз II типа

С. В. Бойчук^{1, 2}, А. Р. Галембикова¹, Б. Р. Рамазанов¹, А. Дусинг²

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Россия, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49;

²Раковый центр Университета г. Питтсбурга;

США, 15232, Пенсильвания, Питтсбург, Центральная авеню, 5117

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Цель исследования — изучить механизмы чувствительности клеточных линий гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) к ингибиторам топоизомераз II типа, а также способность иматиниба модулировать чувствительность ГИСО к вышеуказанным химиопрепаратам.

Материалы и методы. Проведено исследование чувствительности некоторых клеточных линий ГИСО к ингибиторам топоизомераз II типа, а также способности таргетного препарата иматиниба моделировать чувствительность клеток ГИСО к данным химиопрепаратам. Экспрессию маркеров повреждения и репарации ДНК оценивали методом иммуноблоттинга. Апоптоз клеток ГИСО оценивали методом иммуноблоттинга по уровню экспрессии расщепленной формы поли(аденозиндифосфат-рибоза)-полимеразы, а также каспазы-3. Кроме того, подсчет апоптотических клеток проводили методом проточной цитометрии по изменению интенсивности флуоресценции красителя пропидия йодида и обнаружению гиподиплоидных клеток.

Результаты. Обнаружено, что клетки ГИСО чувствительны к ингибиторам топоизомеразы II типа — этопозиду и доксорубину. Вышеуказанные химиопрепараты индуцируют образование двунитевых разрывов ДНК в клетках ГИСО и последующую их гибель по механизму апоптоза. Иматиниб повышает чувствительность клеток ГИСО к данным химиопрепаратам, что может быть обусловлено снижением способности клеток ГИСО справляться с генотоксическим стрессом по причине ослабления процессов гомологичной рекомбинации повреждений ДНК. Иматиниб-индуцированное снижение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО является следствием ее усиленной протеасом-зависимой деградации.

Выводы. Клеточные линии ГИСО чувствительны к ингибиторам топоизомераз II типа. Иматиниб способен повышать чувствительность клеток ГИСО к данным химиопрепаратам.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, иматиниб, химиопрепараты, апоптоз, повреждение и репарация ДНК, рекомбиназа Rad51

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.076–081

Imatinib enhances the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors to topoisomerase II inhibitors

S. V. Boichuk^{1, 2}, A. R. Galembikova¹, B. R. Ramazanov¹, A. Duensing²

¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan, 420012, Russia;

²Hillman Cancer Center, University of Pittsburgh;

5117 Centre Ave, Pittsburgh, PA, 15232, USA

Objective: to study the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to the topoisomerases type II inhibitors and ability of imatinib to enhance GISTs sensitivity to the chemotherapeutic drugs indicated above.

Subjects and Methods. We studied the sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to the topoisomerases II inhibitors and ability of imatinib to enhance GISTs sensitivity to these chemotherapeutic agents. The expression of DNA damage and repair (DDR) markers was examined by western-blotting. Cleaved forms of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3 were served as an apoptotic markers measured by western blotting. Amount of apoptotic cells was counted by flow cytometry analysis by using a propidium iodide DNA staining procedure and counting the numbers of hypodiploid cells.

Results. We observed the sensitivity of GISTs to topoisomerase II inhibitors — doxorubicine and etoposide inducing DNA double-strand breaks and apoptotic cell death. Imatinib enhances GISTs sensitivity to topoisomerase II inhibitors. This might be due to reduced ability of GISTs to repair DNA damage by homologous recombination. Imatinib-induced reduction of Rad51 recombinase might be due to increased proteasome-dependent degradation.

Conclusion. GIST cells are sensitive to topoisomerase II inhibitors (etoposide and doxorubicin) in vitro. Imatinib enhances GISTs sensitivity to the chemotherapeutic agents indicated above.

Key words: gastrointestinal tumors, imatinib, chemotherapeutic agents, DNA damage and repair, apoptosis, Rad51 recombinase

Введение

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) являются гистологически и молекулярно-генетически гетерогенными новообразованиями, происходящими из интерстициальных клеток Каяла, регулирующих в норме моторику желудочно-кишечного тракта. Установлено, что основным патогенетическим механизмом развития большинства ГИСО (до 85 % случаев) является активирующая мутация гена тирозинкиназного рецептора *c-KIT*, связывающегося в норме со стволовым клеточным фактором. В редких случаях (до 5 %) мутации происходят в гене, кодирующем тирозинкиназный рецептор тромбоцитарного фактора роста (например *PDGFR-α*). Так как результатом активирующей мутации гена тирозинкиназного рецептора *c-KIT* в ГИСО является стимуляция их митотической активности и пролиферации, вполне логичной схемой лечения больных ГИСО считается проведение таргетной терапии относительно селективным ингибитором тирозинкиназ — иматинибом (Гливексом), основной механизм действия которого основан на конкурентном взаимодействии с аденозинтрифосфат-связывающим участком тирозинкиназных рецепторов *KIT*, *PDGFR-α* и $-\beta$ и др. На сегодняшний день использование данного препарата считается общепринятым для лечения рецидивирующих и метастатических опухолей, что позволяет увеличить продолжительность жизни больных ГИСО более чем в 2 раза.

Тем не менее, несмотря на впечатляющую эффективность проведения таргетной терапии иматинибом на начальных сроках использования данного препарата, стабилизации опухолевого процесса удается добиться не более чем у 30 % пациентов с ГИСО, а описанные в литературе случаи длительных ремиссий после назначения данной схемы лечения являются единичными. Кроме того, после 2 лет с момента начала проведения таргетной терапии иматинибом более чем у половины пациентов с ГИСО начинает развиваться резистентность к данному препарату, обусловленная развитием вторичных мутаций в клетках опухоли [1, 2]. Вышеизложенное явилось предпосылкой для разработки и внедрения в практическую онкологию таргетных препаратов второго и третьего поколения — сунитиниба (Сутент) [3] и регорафениба (Стиварга) [4, 5], воздействующих сразу на несколько типов тирозинкиназ и подавляющих их активность. Например, было показано, что применение сунитиниба после иматиниба существенно увеличивает время до прогрессирования процесса (27 нед против 6 нед), а регрессия была отмечена у 7–9 % больных [3].

Известно, что проведение химиотерапии больным ГИСО в настоящее время считается нецелесообразным из-за существующей точки зрения о химиорезистентности данных опухолей [6]. Имеются данные о том, что даже несмотря на агрессивные схемы системной химиотерапии средняя выживаемость у больных с неоперабельными и метастатическими ГИСО

не превышает 2 лет. Эффективность химиотерапии в целом составляет не более 10 %, а общая выживаемость при ее проведении — 8–9 мес [7, 8].

Тем не менее результаты проведенных нами ранее исследований показали, что некоторые химиопрепараты могут быть эффективными по отношению к клеточным линиям ГИСО *in vitro* [9]. Примечательно, что данный эффект химиопрепаратов был выявлен как в отношении иматиниб-чувствительных, так и резистентных к иматинибу клеточных линий ГИСО. Изучение состояния различных систем репарации повреждений ДНК в разных клеточных линиях ГИСО выявило ряд существенных изменений в фоновом уровне экспрессии ряда белков, участвующих в репарации повреждений ДНК, что свидетельствует о возможной чувствительности опухолевых клеток ГИСО к некоторым химиопрепаратам, в частности ингибиторам топоизомераз [10].

Исходя из вышеизложенного, представляло интерес изучение противоопухолевой активности ингибиторов топоизомераз II типа в отношении клеток ГИСО, а также способности таргетного препарата иматиниба повышать их чувствительность к вышеуказанным препаратам.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были выбраны клеточные линии ГИСО 882 и Т-1, обладающие чувствительностью к иматинибу. Клетки ГИСО культивировали в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (15 %), антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамин (все реагенты — Invitrogen). Клетки культивировали с иматинибом в течение 24 ч с последующим внесением доксорубина (Sigma) или этопозиды (Calbiochem). В качестве контроля клетки инкубировали с каждым из вышеуказанных препаратов в отдельности. Экспрессию белков оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител. Анализ клеточного цикла, а также подсчет гиподиплоидных (апоптозных) клеток осуществляли методом проточной цитометрии (FACSCanto II, Becton Dickinson). Оценку внутриклеточного распределения белков проводили методом иммунофлуоресцентной микроскопии. В отдельных случаях клетки ГИСО инкубировали с ингибитором протеасом MG-132 (Sigma), а также с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом (Sigma).

Результаты и обсуждение

Выявлена чувствительность клеточных линий ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II — этопозиду и доксорубину (рис. 1). В клетках ГИСО данные препараты время- и дозозависимо индуцировали развитие генотоксического стресса, что проявлялось накоплением двунитевых разрывов ДНК. В пользу этого

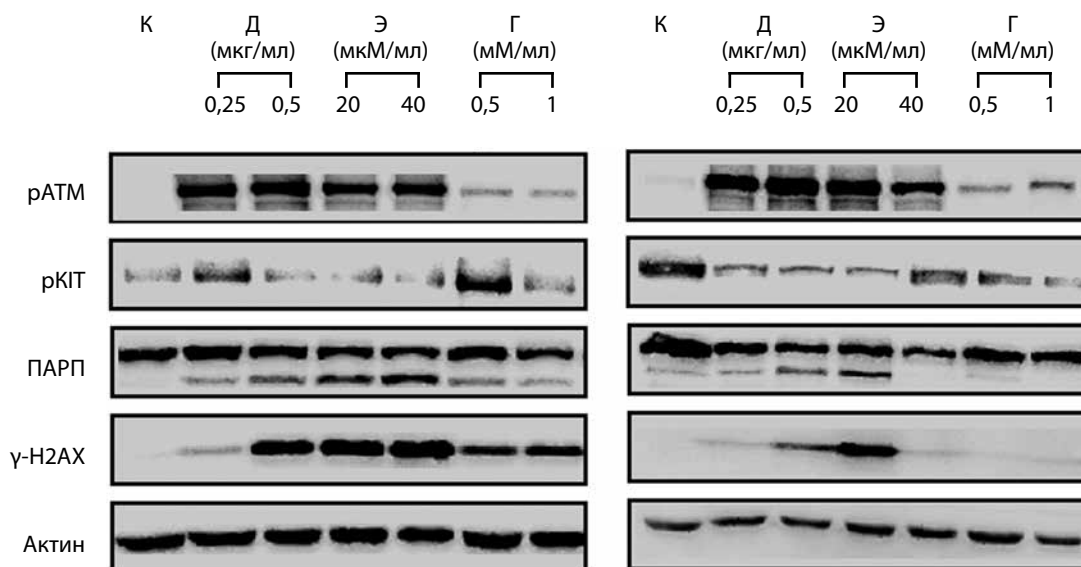


Рис. 1. Состояние белков репарации повреждений ДНК в условиях генотоксического стресса, вызванного химиопрепаратами, в клеточных линиях ГИСО 882 (а) и Т-1 (б). Уровень экспрессии поли(аденозиндифосфат-рибоза)-полимеразы (ПАРП), фосфорилированных форм АТМ-киназы (рАТМ), с-К1Т (рК1Т) и гистона 2А (γ-Н2АХ), а также актина. К – контроль; Д – доксорубицин; Э – этопозид; Г – гидроксимочевина; цифрами отмечена доза препарата

свидетельствовало дозозависимое повышение уровня экспрессии гистона 2А (Н2АХ), фосфорилированного по остаткам серина в положении 139, именуемого в дальнейшем γ-Н2АХ, который является общепризнанным маркером двунитевых разрывов ДНК (см. рис. 1). Было также выявлено существенное повышение фокального распределения данной формы гистона в клетках ГИСО после их инкубации с препаратами по сравнению с контролем. Обнаружено, что уровень экспрессии γ-Н2АХ в клетках ГИСО после их инкубации с исследованными соединениями коррелировал с повышенным уровнем экспрессии фосфорилированной (т.е. активированной) формы АТМ-киназы (рАТМ Ser1981), являющейся, как известно, одним из ключевых факторов, фосфорилирующих Н2АХ и запускающих каскад реакций, направленных на репарацию двунитевых разрывов ДНК (см. рис. 1). Примечательно, что при инкубации клеток ГИСО с химиопрепаратами из группы сравнения (например гидроксимочевиной) уровень экспрессии γ-Н2АХ был существенно ниже по сравнению с клетками ГИСО, инкубированными с доксорубицином и этопозидом.

Обнаруженный нами эффект ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа по отношению к клеткам ГИСО линий 882 и Т-1 был также времязависимым (рис. 2). В частности, было показано увеличение уровня экспрессии γ-Н2АХ и рАТМ Ser1981 в обеих клеточных линиях после их инкубации с доксорубицином (см. рис. 2). Индукция двунитевых разрывов ДНК в клетках ГИСО сопровождалась активацией механизмов репарации вышеуказанных повреждений ДНК, в частности процессов гомологичной рекомбинации. В пользу этого свидетельствовало значительное повышение уровня экспрессии белка Rad51 (см. рис. 2) и его фокального

распределения в клетках ГИСО после инкубации с вышеуказанными химиопрепаратами. Об активации механизмов репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО, инкубированных с химиопрепаратами, также свидетельствовало значительное увеличение уровня экспрессии фосфорилированной (т.е. активированной) формы белка p53 (p53 Ser15). Тем не менее, несмотря на активацию в клетках ГИСО механизмов репарации повреждений ДНК, вызываемых ингибиторами топоизомеразы II, спустя 48 ч инкубации кле-

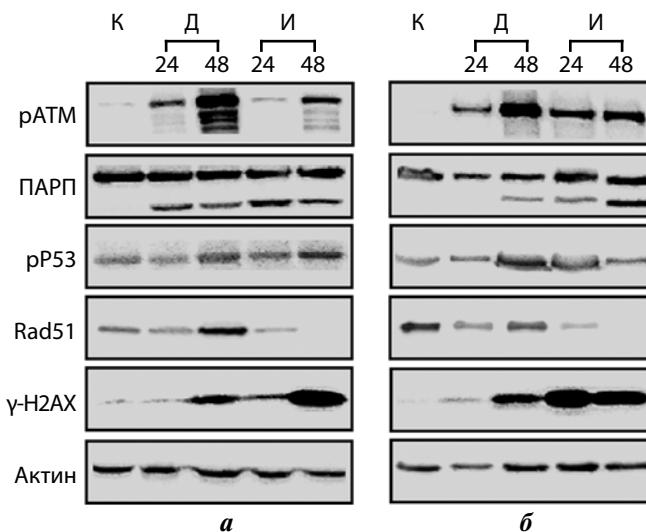


Рис. 2. Состояние белков репарации повреждений ДНК в условиях генотоксического стресса, вызванного доксорубицином и иматинибом, в клеточных линиях ГИСО 882 (а) и Т-1 (б). Уровень экспрессии ПАРП, фосфорилированных форм АТМ-киназы (рАТМ), белка p53 (рP53) и Н2АХ (γ-Н2АХ), а также рекомбиназы Rad51 и актина. К – контроль; Д – доксорубицин; И – иматиниб; цифрами отмечено время экспозиции каждого препарата (в часах)

ток с данными соединениями наблюдалась их гибель по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало дозо- и времязависимое увеличение уровня экспрессии расщепленной формы ПАРП (см. рис. 1, 2). Известно, что расщепленные фрагменты данного фермента (например, 86 и 24 кДа) появляются в результате активации каспазы-3 и каспазы-7, и поэтому они являются общепризнанным маркером апоптоза.

Интересным, на наш взгляд, представляется обнаруженный нами факт накопления γ -H2AX в клетках ГИСО под влиянием иматиниба (см. рис. 2). Появление γ -H2AX в клетках ГИСО, инкубированных с иматинибом, является важным проапоптогенным сигналом и обуславливает способность таргетного препарата индуцировать гибель клеток ГИСО по механизму апоптоза [11–13].

Мы обнаружили, что инкубация клеток ГИСО с иматинибом также приводит к времязависимому снижению уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 (см. рис. 2). Для изучения возможных механизмов снижения уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО под действием иматиниба были проведены следующие эксперименты. Было показано, что в клетках ГИСО линии T-1 период полужизни рекомбиназы Rad51 составляет около 12 ч (рис. 3а), в то время как инкубация клеток ГИСО с иматинибом на фоне ингибитора элонгации мРНК циклогексимида приводила к существенному снижению уровня экспрессии данного белка в аналогичные сроки культивирования (рис. 3б). Одним из возможных механизмов снижения уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО под влиянием иматиниба может быть усиление процессов протеасом-зависимой деградации данного белка. В пользу этого свидетельствуют полученные нами данные о способности ингибитора протеасом MG-132 препятствовать снижению уровня экспрессии белка Rad51 в клетках ГИСО, инкубированных с иматинибом (рис. 4).

Ослабление уровня экспрессии белка Rad51 в клетках ГИСО, инкубированных с иматинибом, может свидетельствовать о способности данного таргетного препарата ослаблять эффективность процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО, а следовательно, увеличивать чувствительность клеток к воздействию химиопрепаратов.

Для проверки этой гипотезы клетки ГИСО культивировали с иматинибом в течение 24 ч с последую-

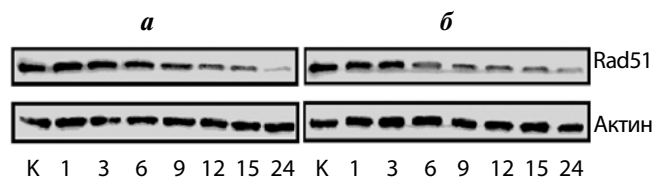


Рис. 3. Уровень экспрессии белков Rad51 и актина в клеточной линии ГИСО T-1 при 24-часовой экспозиции с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом (а) или его комбинацией с иматинибом (б). К — контроль; цифрами обозначено время экспозиции (в часах)

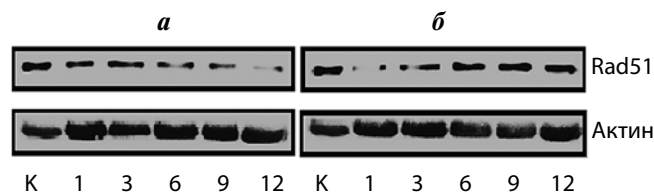


Рис. 4. Уровень экспрессии белков Rad51 и актина в клеточной линии ГИСО T-1 при 12-часовой экспозиции с иматинибом (а) или его комбинацией с ингибитором протеасом MG-132 (б). К — контроль; цифрами обозначено время экспозиции (в часах)

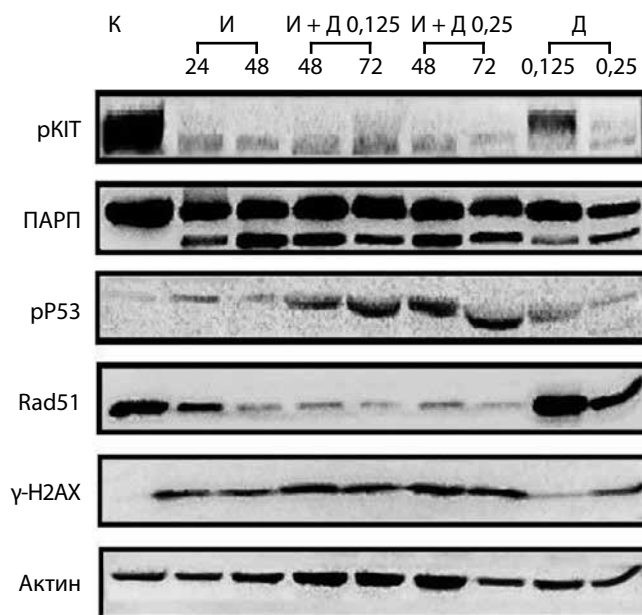


Рис. 5. Состояние белков репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО T-1, инкубированных с иматинибом и доксорубицином. Уровень экспрессии фосфорилированных форм с-KIT (pK1T), белка p53 (pP53), H2AX (γ -H2AX), а также ПАРП, Rad51 и актина. К — контроль; И — иматиниб; Д — доксорубицин; цифрами 24, 48, 72 отмечено время экспозиции каждого препарата (в часах); цифрами 0,125 и 0,25 — концентрация доксорубицина в мкг/мл

щим внесением в культуру клеток ингибиторов топоизомераз II типа — доксорубицина (рис. 5) или этопозидом (рис. 6). Было обнаружено, что культивирование клеток ГИСО с иматинибом и доксорубицином приводит к значимому повышению уровня экспрессии γ -H2AX, а также фосфорилированной формы белка p53 (см. рис. 5). Аналогичный эффект наблюдался при культивировании клеток ГИСО с иматинибом и этопозидом (см. рис. 6). Важным, на наш взгляд, является факт отсутствия повышения уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО в данных экспериментальных условиях, что свидетельствует о несостоятельности процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО, несмотря на наличие значительных повреждений ДНК, а именно двунитевых разрывов. Примечательно, что была отмечена обратная зависимость между уровнем экспрессии рекомбиназы Rad51 и повреждением ДНК, оцениваемым по уровню экспрессии γ -H2AX, что также может свидетельствовать о снижении эффективности

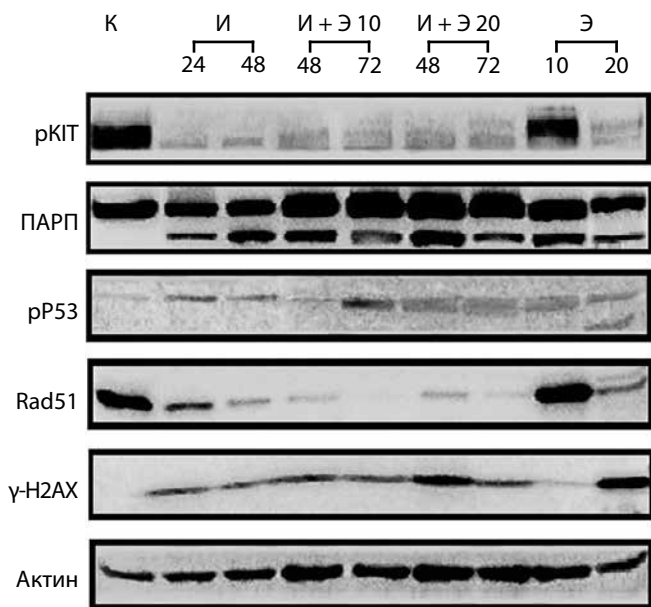


Рис. 6. Состояние белков репарации повреждений ДНК в клетках ГИСО T-1, инкубированных с иматинибом и этопозидом. Уровень экспрессии фосфорилированных форм c-KIT (pKIT), белка p53 (pP53), H2AX (γ-H2AX), а также PARP, Rad51 и актина. К – контроль; И – иматиниб; Э – этопозид; цифры 24, 48, 72 отмечено время экспозиции каждого препарата (в часах), цифрами 10 и 20 – концентрация этопозидов в мкМ/мл

процессов репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации.

Результатом несостоятельности процессов репарации повреждений ДНК в данных экспериментальных условиях явилось значимое усиление экспрессии расщепленной формы PARP (по сравнению с клетками ГИСО, инкубированными только с химиопрепаратом), что свидетельствовало об усилении гибели клеток ГИСО по механизму апоптоза. Усиление гибели клеток ГИСО по механизму апоптоза было подтверждено методом проточной цитометрии, позволившим выявить достоверно значимое повышение количества гиподиплоидных клеток по сравнению с клетками ГИСО, инкубированными только с иматинибом или ингибиторами топоизомераз II типа.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о способности некоторых ингибиторов топоизомераз II типа индуцировать гибель клеток ГИСО по механизму апоптоза и, таким образом, ставят под сомнение традиционную точку зрения о химиорезистентности клеток ГИСО. Известно, что данная точка зрения ба-

зировалась в основном на результатах клинических исследований, проведенных задолго до внедрения в практическую онкологию точных методов диагностики ГИСО, позволяющих обнаружить совокупность гистологических и иммуногистохимических признаков, отличающих данный тип опухолей от других гладкомышечных и нейрогенных новообразований (например лейомиом, лейомиосарком и шванном). Известно, что последние отличаются устойчивостью к большинству современных химиопрепаратов. Поэтому присутствие пациентов с вышеуказанными новообразованиями могло существенным образом повлиять на достоверность результатов проведенных ранее клинических исследований.

Обнаруженный нами факт иматиниб-индуцированного снижения уровня рекомбиназы Rad51 в клетках ГИСО свидетельствует об ослаблении механизмов гомологичной рекомбинации в этих клетках, что делает их более чувствительными к генотоксическому стрессу, индуцируемому доксорубицином и этопозидом. Данный факт может обуславливать повышенную чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам топоизомераз II типа на фоне проведения таргетной терапии.

Заключение

Некоторые клеточные линии ГИСО обладают чувствительностью к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, индуцирующим их гибель по механизму апоптоза. Инкубация клеток ГИСО с иматинибом в значительной степени повышает их чувствительность к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II – доксорубицину и этопозиду. Этот феномен может являться следствием способности иматиниба снижать эффективность процессов гомологичной рекомбинации в клетках ГИСО. Полученные нами экспериментальные данные о способности иматиниба повышать чувствительность клеток ГИСО к некоторым химиопрепаратам свидетельствуют о потенциальной возможности и перспективности проведения комбинированной (иматиниб + ингибитор ДНК-топоизомеразы II типа) терапии больным с неоперабельными формами ГИСО, а также рефрактерными к монотерапии таргетным препаратом.

Благодарности

Работа финансировалась грантом Российского научного фонда № 14-15-00342.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gramza A. W., Corless C. L., Heinrich M. C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 2009;15(24):7510–8.
2. Verweij J., Casali P. G., Zalcberg J. et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. Lancet 2004;364(9440):1127–34.
3. Hopkins T. G., Marples M., Stark D. Sunitinib in the management of gastrointestinal stromal tumours (GISTs). Eur J Surg Oncol 2008;34(8):844–50.

4. Boichuk S., Rausch J., Duensing A. New developments in management of gastrointestinal stromal tumors: regorafenib, the new player in the team. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 2014;4:1–10.
5. Demetri G. D., Reichardt P., Kang Y. K. et al. GRID study investigators. Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381(9863):295–302.
6. Dematteo R. P., Heinrich M. C., El-Rifai W. M., Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* 2002;33(5):466–77.
7. Blay J. Y., Reichardt P. Advanced gastrointestinal stromal tumor in Europe: a review of updated treatment recommendations. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9(6):831–8.
8. Casper E. S. Gastrointestinal stromal tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2000;1(3):267–73.
9. Boichuk S., Lee D. J., Mehalek K. R. et al. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2014;74(4):1200–13.
10. Бойчук С. В., Рамазанов Б. Р., Галембикова А. Р. и др. Состояние системы репарации повреждений ДНК в гастроинтестинальных опухолях и перспективы их терапии. *Казанский медицинский журнал* 2014;(6):888–91.
- [Boichuk S. V., Ramazanov B. R., Galembikova A. R. et al. Condition of repair system of DNA damage in gastrointestinal tumors and prospects of their therapy. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2014;(6):888–91. (In Russ.)].
11. Bauer S., Parry J. A., Mühlenberg T. et al. Proapoptotic activity of bortezomib in gastrointestinal stromal tumor cells. *Cancer Res* 2010;70(1):150–9.
12. Liu Y., Tseng M., Perdreau S. A. et al. Histone H2AX is a mediator of gastrointestinal stromal tumor cell apoptosis following treatment with imatinib mesylate. *Cancer Res* 2007;67(6):2685–92.
13. Wu D., Ingram A., Lahti J. H. et al. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem* 2002;277(14):12001–8.

Биохимические критерии токсичности терапии высокими дозами метотрексата у детей с остеосаркомой

А. М. Стрижевская¹, Е. Г. Головня¹, А. З. Дзямпаев², В. Н. Байкова¹

¹Централизованный клиничко-лабораторный отдел НИИ клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23;

²отделение опорно-двигательного аппарата НИИ детской онкологии и гематологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Александра Михайловна Стрижевская Strizhevsky@yandex.ru

Метотрексат (Мtx) — цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты. Высокие дозы (ВД) Мtx в детской онкологии применяются для лечения остеосаркомы (ОС) и других типов опухолей и позволяют достичь 5-летней безрецидивной выживаемости до 80 %. Однако высокая токсичность Мtx является серьезным ограничением в достижении максимального лечебного действия и в большинстве случаев обуславливает возникновение у больных серьезных побочных эффектов со стороны различных органов и систем. Лечение должно проводиться под строгим контролем лабораторных исследований, в первую очередь терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ), концентрации Мtx в сыворотке крови и других биохимических показателей.

Обследовано 246 детей (125 мальчиков и 121 девочка) в возрасте от 5 до 16 лет с ОС (средний возраст 12,2 года), которые находились на лечении в НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» с 2006 по 2013 г. Больным было проведено от 1 до 8 курсов ВД Мtx — 8 или 12 г/м² за 4 ч инфузии на фоне щелочной прегидратации. Лейковорин назначался внутривенно через каждые 6 ч, начиная с 24 ч от начала инфузии Мtx. Проведено 1137 курсов ТЛМ Мtx методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа на анализаторе Tdx/Fx (Abbott, США). Отработана методика мониторинга гомоцистеина (Нсу) в сыворотке крови на анализаторе Vitros 5/IFS (Johnson & Johnson, США) в течение всего курса ВД Мtx. В группах рассчитаны фармакокинетические показатели Мtx: площадь под фармакокинетической кривой (МtxAUC), клиренс Мtx (Cl_{Mtx}), период полувыведения (T_{1/2}) и общее время выведения (T_{total}).

При 1050 курсах ВД Мtx выведение Мtx было нормальным и соответствовало следующим значениям: через 4 ч — 1109 ± 283 мкмоль/л; через 24 ч — 4,67 ± 0,95 мкмоль/л; через 42 ч — 0,38 ± 0,16 мкмоль/л; через 48 ч — менее 0,23 ± 0,04 мкмоль/л; через 72 ч — 0,07 ± 0,03 мкмоль/л; через 96 ч — 0,03 ± 0,01 мкмоль/л. Замедленное выведение Мtx выявлено при 87 курсах, что составляет 7,6 % от всех курсов. По всем измеряемым параметрам: концентрации выведения Мtx по часам, T_{total}^{Mtx}, Cl_{Mtx}, T_{1/2} — получены статистически достоверные различия между нормальным и замедленным выведением Мtx. Для пациентов группы замедленного выведения было характерно развитие гепатотоксичности, также наблюдались 4 случая возникновения острой почечной недостаточности. Проведение мониторинга биохимических показателей (аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы) также позволило выявить различия между двумя группами — гепатотоксичность непосредственно зависела от МtxAUC, Cl_{Mtx} и T_{total}, причем амплитуда изменения активностей ферментов от курса к курсу уменьшалась.

Отработанная нами методика мониторинга Нсу в сыворотке крови в течение курса ВД Мtx позволила выявить, что Нсу метаболически взаимосвязан с Мtx — чем выше концентрация Мtx, тем большее количество Нсу выбрасывается в кровь. Нсу может служить маркером эффективности подавления трансформации фолатов. При замедленном выведении Мtx уровень Нсу значительно повышается в крови. Это также свидетельствует о том, что он может служить маркером фармакодинамического воздействия ВД Мtx.

Ключевые слова: дети, высокие дозы метотрексата, остеосаркомы, терапевтический лекарственный мониторинг, токсикокINETИКА, фармакокинетика, гомоцистеин

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.1.082—089

Biochemical criteria of toxicity of therapy with high doses of methotrexate in children with osteosarcoma

A. M. Strizhevskaya¹, E. G. Golovnya¹, A. Z. Dzampaev², V. N. Baykova¹

¹Centralized Clinical and Laboratory Department, Research Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 23 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia;

²Department of Musculoskeletal System, Research Institute of Children Hematology and Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 23 Kashirskoye Highway, Moscow, 115478, Russia

Methotrexate (Mtx) is a cytotoxic drug from the group of antimetabolites, folic acid antagonists. High-dose (HD) Mtx in pediatric oncology are used for the treatment of osteosarcoma (OS), and other types of tumors. This therapy has allowed to achieve a five-year relapse-free survival rates up to 80 % in patients with OS. However, the high toxicity of Mtx is a serious constraint in achieving the maximum therapeutic effect, which in most cases poses the occurrence of side effects in patients on various organs and systems. Treatment should be under strict laboratory monitoring, primarily therapeutic drug monitoring the concentration of Mtx in serum.

246 children (boys — 125, girls — 121) aged 5 to 16 years with osteosarcoma (mean age 12.2 years) who were treated in N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center from 2006 to 2013. Patients were conducted from 1 to 8 courses HD Mtx at a dose of 8 or 12 g/m², administered within 4 h of infusion on the background of alkaline prehydrate. Leucovorin was administered intravenously, every 6 hours, starting 24 h from the start of the Mtx infusion. 1137 courses of HD Mtx were conducted with FPIA method (analyzer TDx/Flx, Abbott, USA). The technique of monitoring of homocysteine (Hcy) in the blood serum by analyzer Vitros 5/IFS (Johnson & Johnson, USA) during the entire course of high-dose Mtx was tested. In groups calculated pharmacokinetic parameters Mtx were tested: area under the pharmacokinetic curve (AUC^{Mtx}), clearance of methotrexate (Cl_{Mtx}), the elimination half-life ($T_{1/2}$) and the total time of excretion (T_{total}). Normal excretion of Mtx was revealed at 1050 courses Mtx, corresponding to the following values: 4 h — $1109 \pm 283 \mu\text{mol/l}$; 24 h — $4,67 \pm 0,95 \mu\text{mol/l}$; 42 h — $0,38 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$; 48 h — less than $0,23 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$; 72 h of $0,07 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$; 96 h of $0,03 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$. At 87 courses identified delayed Mtx excretion, accounting for 7.6 % of all courses. In all measured parameters: hourly concentration of Mtx, T_{total}^{Mtx} , AUC^{Mtx} , Cl_{Mtx} , $T_{1/2}$, is obtained statistically significant differences between normal and delayed Mtx excretion. Patients in group of delayed excretion of methotrexate were characterized by the development of hepatotoxicity, there were also observed 4 cases of the occurrence of acute renal failure.

Monitoring of biochemical parameters (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase) also revealed differences between the two groups — hepatotoxicity directly depended on AUC^{Mtx} , Cl_{Mtx} and T_{total}^{Mtx} and the amplitude changes in activities of enzymes from course to course by increasing the number of course decreased.

Our developed methodology of monitoring of Hcy in serum during the course of HD Mtx revealed that Hcy metabolic interconnected with Mtx — the higher the concentration of Mtx, the greater the amount of Hcy released into the blood. Hcy has a close metabolic relationship with Mtx — it can serve as a marker of the efficiency of suppression of the transformation of folates. During slow excretion of Mtx Hcy significantly increased in the blood, which also suggests that it can serve as a marker of pharmacodynamic effects of HD Mtx.

Key words: children, high-dose methotrexate, cancer, therapeutic drug monitoring, toxicokinetics, toxicity, homocysteine

Введение

Современный подход к лечению онкологических больных требует индивидуализации терапии. Каждый случай должен рассматриваться с точки зрения не только общего протокола, но и личных физиологических особенностей пациента. Только такой подход может привести к улучшению качества лечения, уменьшению побочных эффектов при химиотерапии и хирургических вмешательствах и в конечном итоге улучшить выживаемость пациентов.

Одним из самых современных направлений в области клинической биохимии и индивидуализации терапии онкобольных является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ). Он основан на определении концентрации лекарственных препаратов, их метаболитов или других биологически активных веществ в плазме крови или других тканях организма в различные промежутки времени после введения в целях установления соответствия ее терапевтическому диапазону и выработки рекомендаций по коррекции режима дозирования [1]. Таким образом, иначе ТЛМ можно назвать фармакокинетическим мониторингом. Цели ТЛМ — определение правильного режима и дозировки лекарства; выявление наиболее эффективной его концентрации для достижения успешного лечения; предупреждение развития токсических эффектов; контроль происходящих изменений в каждый период лечения с возможностью менять дозировку препаратов в зависимости от состояния пациентов; изучение взаимозависимости различных факторов при назначенной терапии [2]. В связи с вышесказанным дети, страдающие злокачественными опухолями и получающие химиотерапевтическое лечение, особенно нуждаются в ТЛМ.

Также существует фармакодинамический ТЛМ, который используется в тех случаях, когда регистри-

ровать непосредственно эффект препарата, как токсический, так и терапевтический, невозможно [3]. При этом измеряют косвенные показатели — биомаркеры. Именно поэтому, в связи с возросшей потребностью в индивидуализации терапии, сейчас так необходим поиск новых биохимических маркеров токсичности и эффективности лечения [4].

Высокие дозы (ВД) метотрексата (Mtx) в детской онкологии применяются для лечения остеосаркомы (ОС), острого лимфобластного лейкоза, неходжкинской лимфомы и других типов опухолей. У пациентов с ОС это позволяет достичь 5-летней безрецидивной выживаемости до 80 % [5]. Однако проблема высокой экстра- и интраиндивидуальной изменчивости в фармакокинетике Mtx остается нерешенной [6]. В 10 % случаев наблюдается угрожающее жизни замедленное выведение Mtx, которое индуцирует Mtx-гепатотоксичность, острую почечную недостаточность, вызываемую преципитацией Mtx на эпителии почечных канальцев [7, 8]. Лечение должно проводиться под строгим контролем лабораторных исследований, в первую очередь мониторинга концентрации самого препарата. Характер и время проявления побочных реакций, а также скорость их устранения зависят не только от дозы Mtx, его концентрации и длительности пребывания в организме, но и от состояния ферментных систем организма, функциональной полноценности выделительных органов [9].

Используемые в настоящее время лабораторные показатели — аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — не являются специфичными для ВД Mtx, реагируют и на другие виды химиотерапии, не всегда и не полно отвечают на введение Mtx. Оценка воздействия ВД Mtx на организм ребенка требует серьезного теорети-

ческого анализа и исследования с помощью новых биохимических маркеров, которые могли бы предсказать токсичность Mtx ранее других биохимических показателей. Для возможности оценки как степени эффективности подавления Mtx образования фолатов (рис. 1), так и степени токсичности Mtx уже давно предложен фармакодинамический маркер — уровень содержания аминокислоты гомоцистеина (Нсу), который является интермедиальным метаболитом в обмене фолатов [10–12].

Нсу — природная серосодержащая аминокислота, не встречающаяся в белках. Нсу не поступает в организм с пищей, являясь продуктом трансметилирования — в каскаде реакций он образуется из метионина (Met), алифатической серосодержащей аминокислоты, а затем при участии тетрагидрофолата превращается обратно в Met. В плазме крови свободный (восстановленный) Нсу присутствует в небольших количествах (1–2 %). Примерно 20 % находится в окисленном состоянии, преимущественно в виде смешанного дисульфида цистеинил-Нсу и Нсу. Около 80 % Нсу связывается с белками плазмы крови, в основном с альбумином, образуя дисульфидную связь с цистеином [13, 14].

Несмотря на то, что Нсу впервые описали еще в 1932 г., основные публикации о связи его повышенного содержания с патологическими состояниями человека (сердечно-сосудистыми заболеваниями, патологиями беременности) появились только в последние десятилетия. Тогда же стали проводиться популя-

ционные исследования, связанные с гипергомоцистеинемией [15].

Mtx ингибирует образование тетрагидрофолата, ингибируя фермент дигидрофолатредуктазу [11, 12]. Дигидрофолат не восстанавливается в тетрагидрофолат, который необходим для превращения Нсу в Met (см. рис. 1). Поэтому накопление Нсу при введении ВД Mtx — биохимическая основа отражения степени подавления синтеза фолатов [16].

В международном опыте отмечено лишь несколько исследований, посвященных определению концентрации Нсу во время терапии ВД Mtx различных опухолей, однако в России они ранее не проводились [17].

Материалы и методы

В настоящую исследовательскую работу были включены данные о 246 детях в возрасте от 5 до 16 лет (средний возраст 12,2 года) с ОС, которые находились на лечении в НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» с 2006 по 2013 г. Они получали лечение согласно протоколу комплексной химиотерапии ОС (ОС-2006), разработанному и утвержденному в НИИ ДОГ. Соотношение пациентов по полу составило 1,03:1 (мальчиков — 125, девочек — 121). Всего проведено 1137 курсов терапии ВД Mtx. Больным проводилось от 1 до 8 курсов терапии ВД Mtx — 8 или 12 г/м² за 4 ч инфузии на фоне щелочной прегидратации. Лейковорин назначался внутривенно через каждые 6 ч, начиная с 24 ч от начала инфузии Mtx. При такой скорости выведения Mtx и применяемой схеме лечения вероятность развития побочных эффектов считается минимальной.

Кровь из вены забиралась в сроки 0; 4; 24; 42; 48; 72 ч и далее до полного выведения Mtx, в вакуумные пробирки марки Sarstedt, тип Monovette® объемом 7,5 мл. Кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 оборотах на центрифуге Elmi CM-6M.

Определение Mtx проводили методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа (ФПИА) на анализаторе Tdx/Flx (Abbott, США). ФПИА — гомогенный конкурентный метод иммунного анализа, основанный на двух принципах: конкурентного связывания белков и флуоресцентной поляризации. Рассчитаны фармакокинетические показатели Mtx: площадь под фармакокинетической кривой ($M_{tx}AUC$), клиренс (Cl_{Mtx}), период полувыведения ($T_{1/2}$) и общее время выведения (T_{total}).

Определение Нсу проводили в те же сроки наблюдения на анализаторе VITROS 5.1FS (Ortho Clinical Diagnostics, США). Нормальное содержание Нсу в сыворотке здоровых детей составляло $5,1 \pm 1,5$ мкмоль/л.

Определение биохимических показателей (АЛТ, АСТ, ЛДГ) проводили на автоматическом анализаторе Pentra 400 (Horiba ABX, Франция) с диапазоном длин волн от 190 до 1100 нм. В качестве биохимических критериев использовали пороговые значения АЛТ < 40 Ед/л, АСТ < 38 Ед/л, ЛДГ 226–451 Ед/л, установленные в группе практически здоровых детей.

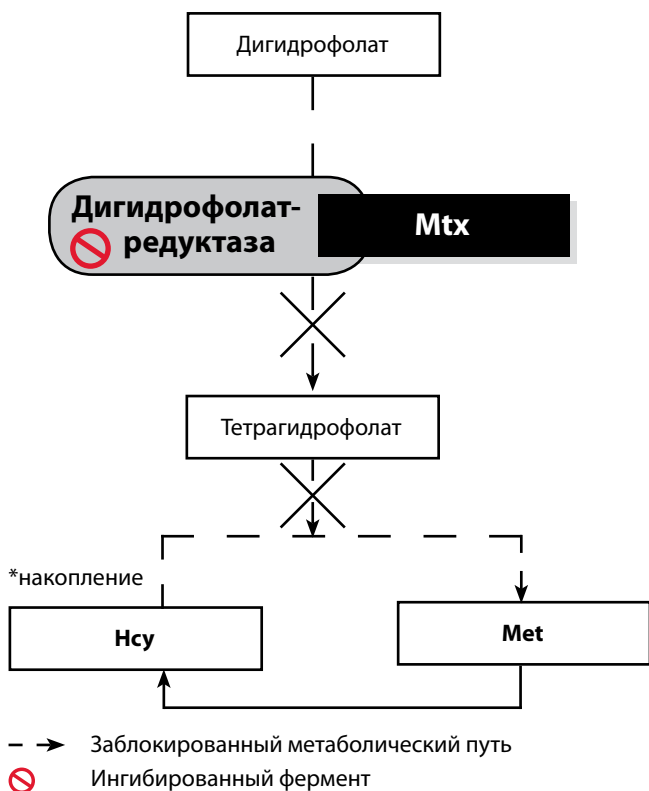


Рис. 1. Метаболизм Нсу в условиях терапии ВД Mtx

Для статистической обработки результатов исследования использовались процедуры математической статистики, реализованные в программе SPSS 11.0 for Windows, Origin 6.1, MS Excel 2007. Расчет фармакокинетических параметров ($M_{tx}AUC$, Cl_{Mtx}) проводился с помощью программы MedCalc 11.6.10. Определение биокинетических параметров восстановления показателей гепатотоксичности осуществляли в программе Origin 40.

Результаты и обсуждение

При обработке данных ТЛМ по определению концентрации Mtx при 1050 курсах ВД Mtx она соответствовала следующим значениям: на сроке 4 ч — 1109 ± 283 мкмоль/л; 24 ч — $4,67 \pm 0,95$ мкмоль/л; 42 ч — $0,38 \pm 0,16$ мкмоль/л; 48 ч — менее $0,23 \pm 0,04$ мкмоль/л; 72 ч — $0,07 \pm 0,03$ мкмоль/л; 96 ч — $0,03 \pm 0,01$ мкмоль/л. Эти пациенты были отнесены к группе с нормальным выведением Mtx (табл. 1).

К 4 ч достигалась максимальная концентрация Mtx, затем она прогрессивно снижалась и к 24 ч составила $4,67 \pm 0,95$ мкмоль/л. Через 24 ч начиналось введение антидота Mtx — лейковорина, который обеспечивает защиту клеток от токсического воздействия Mtx. Полное выведение Mtx в неосложненных случаях занимает 96 ± 24 ч (рис. 2).

Как следует из табл. 1, выявлено два типа фармакокинетики Mtx — **нормальное и замедленное выведение**, различия между группами статистически достоверны. Для нормального выведения $T_{1/2}$ составляет $7,7 \pm 0,7$ ч; $M_{tx}AUC$ — 11791 ± 500 мкмоль/л⁻¹ × ч⁻¹. $M_{tx}AUC$ характеризует общее количество воздействующего на организм препарата и время контакта с ним.

Вторую группу представляли пациенты с замедленным выведением Mtx (рис. 2, см. табл. 1), у которых было отмечено статистически значимое повышение концентрации Mtx в среднем на каждом из временных

промежутков ТЛМ, увеличение T_{total} (до 360 ч), $T_{1/2}$ и $M_{tx}AUC$, а также снижение Cl_{Mtx} . Замедленное выведение выявлено при 87 курсах введения ВД Mtx, что составило 7,6 % от всех исследуемых курсов. По всем измеряемым параметрам: концентрации выведения Mtx по часам, T_{total} , $M_{tx}AUC$, Cl_{Mtx} , $T_{1/2}$ — получены статистически достоверные различия между нормальным и замедленным выведением Mtx. Для пациентов с замедленным выведением Mtx было характерно развитие тяжелой гепатотоксичности, а в 4 случаях наблюдалась также острая почечная недостаточность.

Таблица 1. Фармакокинетические характеристики Mtx при применении его в ВД для лечения ОС

Параметр	Нормальное выведение	Замедленное выведение
Доза, г/м ²	8; 12	8; 12
Площадь поверхности тела, м ²	$1,58 \pm 0,21$	$1,57 \pm 0,22$
Общая средняя доза, г	$18,96 \pm 5,2$	$19,96 \pm 6,2$
Концентрация Mtx в крови, мкмоль/л	4 ч	$1109 \pm 283^*$
	24 ч	$4,67 \pm 0,95^*$
	42 ч	$0,38 \pm 0,16^*$
	48 ч	$0,23 \pm 0,04^*$
	72 ч	$0,07 \pm 0,03^*$
	96 ч	$0,03 \pm 0,01^*$
T_{total} , ч	$96 \pm 24^*$	$208 \pm 120^*$
$M_{tx}AUC$, мкмоль/л ⁻¹ × ч ⁻¹	11791 ± 500	16611 ± 10231
Cl_{Mtx} , л × ч ⁻¹	$3,7 \pm 1,3$	$2,5 \pm 1,5$
$T_{1/2}$, ч	$7,7 \pm 0,7^*$	$11,5 \pm 10,7^*$

Примечание. * — статистическая достоверность между группами ($p < 0,05$).

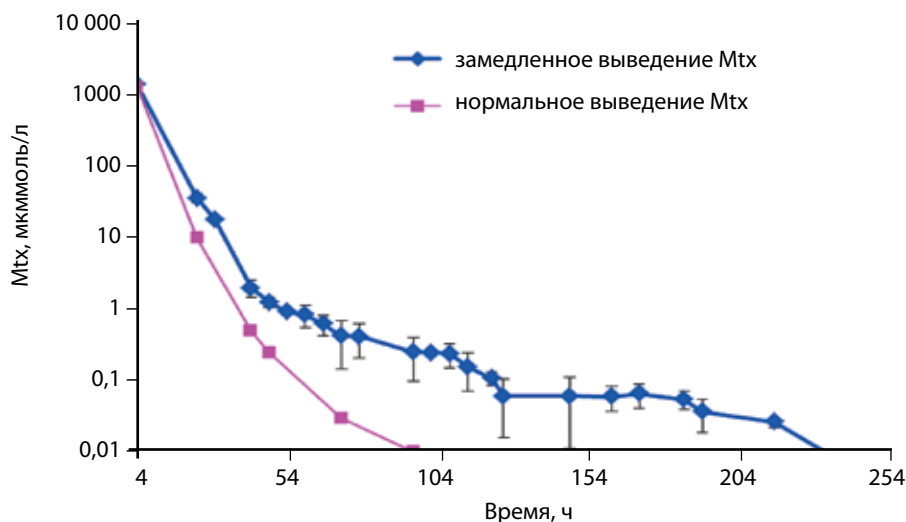


Рис. 2. Кривые выведения Mtx у пациентов с нормальным и замедленным его выведением

Проведение мониторинга биохимических показателей позволило выявить следующие особенности. При нормальном выведении Mtx к 24 ч от начала терапии наблюдалось увеличение активности АЛТ до 500 Ед/л. С этого момента активность АЛТ снижалась, к 96 ч значения достигали в среднем $210,1 \pm 105,4$ Ед/л, т. е. восстанавливались, но не во всех случаях. Аналогично развивалось изменение активностей АСТ и ЛДГ. У пациентов с замедленным выведением Mtx к 24 ч уровень АЛТ достигал в среднем 1581 Ед/л, т. е. превышал норму в десятки раз. Даже к моменту полного выведения Mtx уровень ферментов оставался в 2,5–7,5 раза выше нормы и возвращался к ней в среднем к 12–13-м суткам. Аналогичная ситуация складывалась и для АСТ и ЛДГ. Гепатотоксичность в данном случае зависит от концентрации лекарственного препарата в плазме и времени его экспозиции. На рис. 3 представлены кривые изменения активности АЛТ при нормальном и замедленном выведении Mtx.

Нами проведен анализ средних уровней АЛТ, АСТ и ЛДГ в зависимости от порядкового номера курса терапии и времени относительно введения препарата (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют, что степень изменения активности ферментов после введения Mtx при увеличении номера курса уменьшается.

Для АЛТ на более поздних курсах активность фермента приближается к состоянию до введения на 4-й день, а на первых курсах на 4-й день превышает начальный уровень в несколько раз. Для ЛДГ объем выброса фермента в кровь максимальный на 1-м курсе лечения и в дальнейшем держится на уровне 3/4 от максимума 1-го курса. Содержание ЛДГ до вве-

дения токсического агента также остается на одном уровне.

Определены корреляции между активностью ферментов и концентрацией Mtx. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Корреляционная зависимость между концентрацией Mtx и показателями гепатотоксичности

Группа	Коэффициент корреляции		
	Mtx:АЛТ	Mtx:АСТ	Mtx:ЛДГ
Нормальное выведение Mtx	0,73	0,94	0,96
Замедленное выведение Mtx	0,79	0,88	0,86

Таким образом, активность АЛТ, АСТ и ЛДГ изменяется в связи с введением Mtx, однако с каждым последующим курсом достоверность этих показателей уменьшается. К тому же они не являются специфическими, отражая нарушение функционирования гепатоцитов в целом, которое, в свою очередь, может быть вызвано предыдущим лечением или другими факторами, не относящимися к терапии ВД Mtx.

Современный подход к лечению онкологических больных и индивидуализации терапии требует поиска более точных маркеров, позволяющих оценивать как токсичность терапии, так и ее эффективность. Этому и способствует определение Hcy при терапии ВД Mtx.

Как следует из табл. 3 и рис. 5, у всех включенных в исследование пациентов с нормальным выведением Mtx уровень Hcy на начало терапии соответствовал возрастной норме — $5,4 \pm 1,45$ мкмоль/л. К окон-

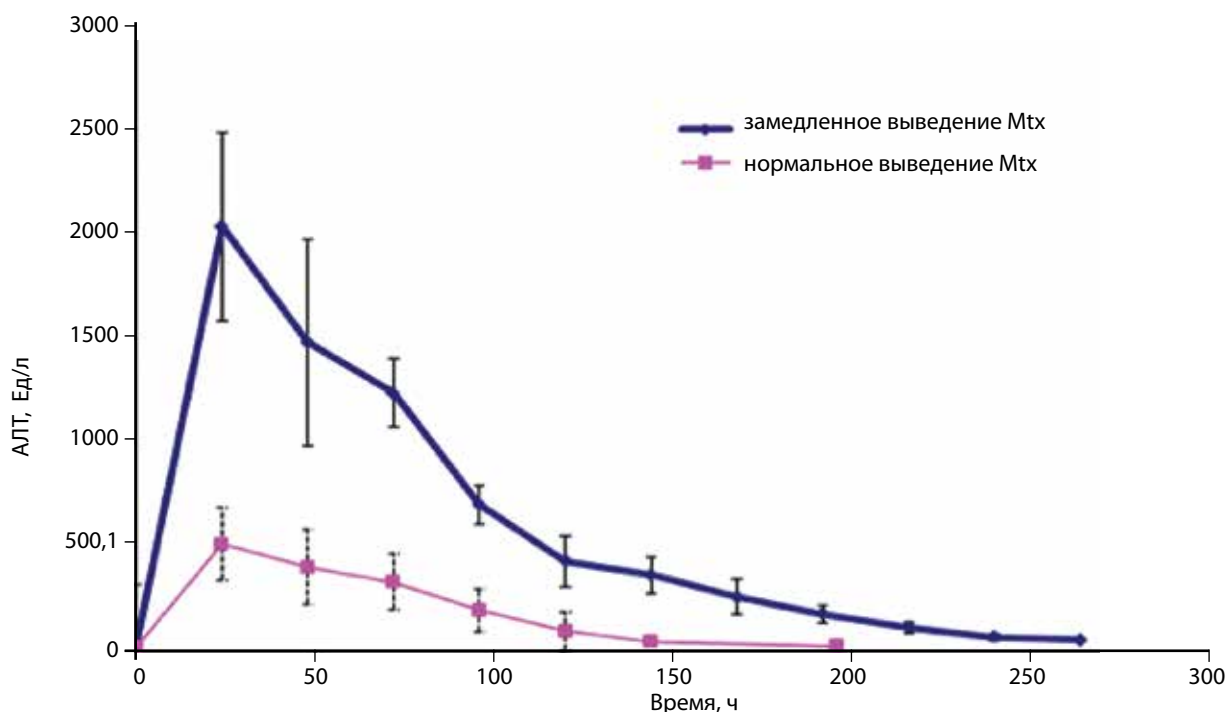


Рис. 3. Изменение активности АЛТ при нормальном и замедленном выведении Mtx

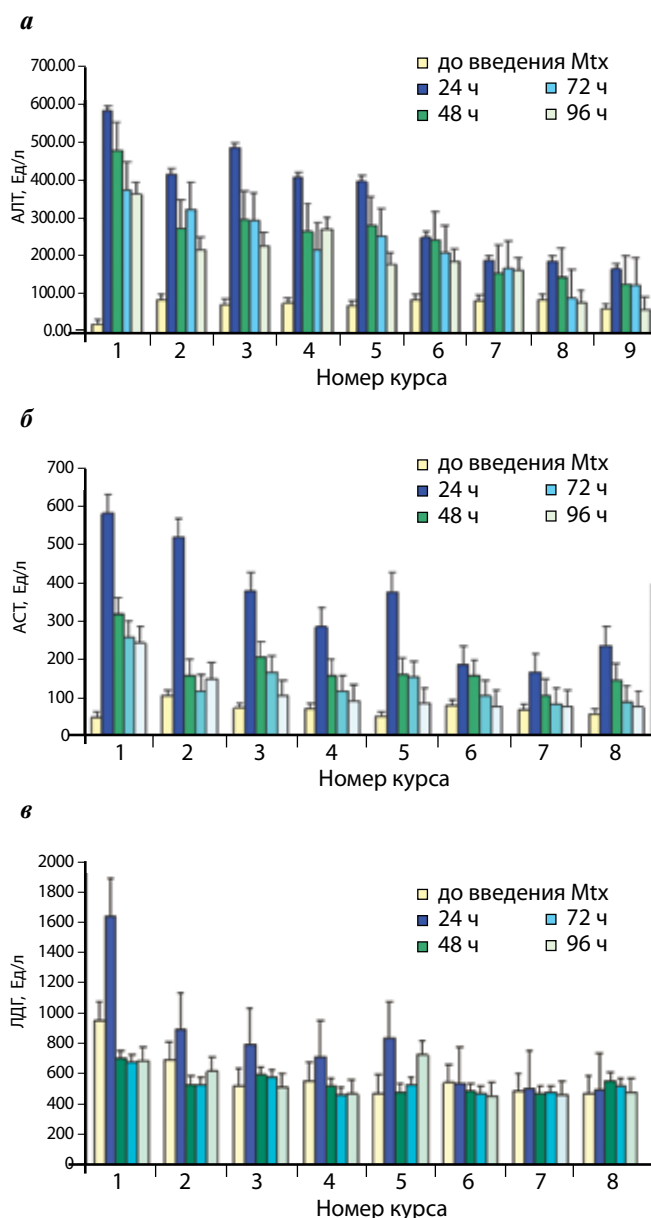


Рис. 4. Изменение активности АЛТ (а), АСТ (б) и ЛДГ (в) по средним значениям концентрации в зависимости от курса ВД Мtx

чанию 4-часовой инфузии Мtx концентрация сывороточного Нсу быстро возрастала с $5,4 \pm 1,5$ до $9,5 \pm 3,2$ мкмоль/л.

После окончания инфузии Мtx концентрация Нсу продолжала возрастать, в среднем к началу 24-го часа

достигала значений $15,6 \pm 5,5$ мкмоль/л. После начала введения лейковорина на сроке 24 ч концентрация Нсу начинала снижаться (см. рис. 5). К 42 ч она была равна в среднем $11,6 \pm 3,4$ мкмоль/л, к 48 ч — $8,8 \pm 3,2$ мкмоль/л. К 96 ч концентрация Нсу достигала значений $4,7 \pm 1,2$ мкмоль/л, т.е. становилась ниже концентрации до начала терапии в среднем на 1,5 мкмоль/л.

На рис. 5 представлен график изменения концентрации Нсу у пациентов с замедленным выведением Мtx. У них были выявлены следующие особенности. Концентрация Нсу возрастала больше, чем у больных с нормальным выведением Мtx, за первые 24 ч достигая значения $24,7 \pm 10$ мкмоль/л. После введения лейковорина на сроке 24 ч снижение концентрации Нсу не наступало, она продолжала расти и к 42 ч достигала в среднем значений $20,5 \pm 5,1$ мкмоль/л. После 42 ч концентрация Нсу постепенно снижалась, однако для ее восстановления требовалось гораздо больше времени, чем при нормальном выведении Мtx. Различие в концентрации Нсу между нормальным и замедленным выведением статистически достоверно ($p < 0,034$).

При анализе данных об изменении концентрации Нсу с 1-го по 8-й курс терапии ВД Мtx был выявлен ряд особенностей. Наиболее выраженный ответ, характеризующийся повышением концентрации Нсу, наблюдался в течение 1-го курса у первичных пациентов — концентрация Нсу к 24 ч достигала в среднем

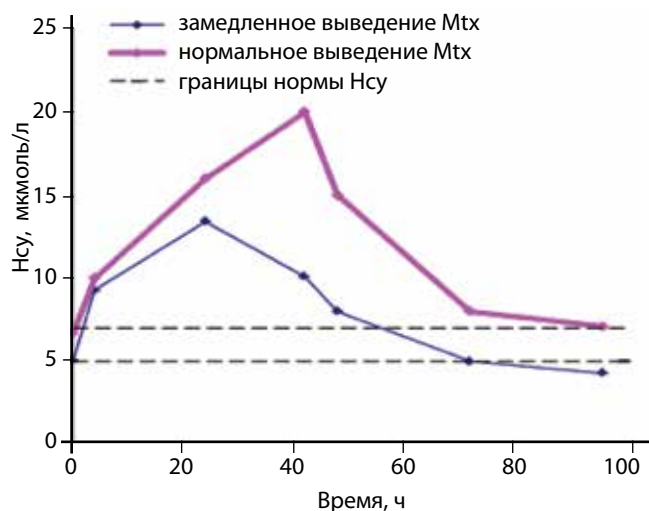


Рис. 5. Изменение концентрации Нсу в крови пациентов при терапии ВД Мtx в случае нормального и замедленного выведения Мtx

Таблица 3. Концентрации Нсу в крови пациентов от 0 до 96 ч после введения ВД Мtx

Группа	Концентрация Нсу, мкмоль/л						
	0 ч	4 ч	24 ч	42 ч	48 ч	72 ч	96 ч
Нормальное выведение Мtx	$5,4 \pm 1,5$	$9,5 \pm 3,2$	$15,6 \pm 5,5$	$11,6 \pm 3,4^*$	$8,8 \pm 3,2^*$	$5,9 \pm 1,3^*$	$4,7 \pm 1,3^*$
Замедленное выведение Мtx	$6,7 \pm 2,5$	$10,2 \pm 4,4$	$16,1 \pm 3,8$	$20,5 \pm 4,1^*$	$15,4 \pm 3,2^*$	$8,3 \pm 2,1^*$	$7,1 \pm 1,2^*$

Примечание. * — статистическая достоверность между группами ($p < 0,05$).

$20,3 \pm 5,1$ мкмоль/л. При последовательном измерении Нсу на разных курсах терапии ВД Мtx было выявлено, что с каждым последующим курсом наблюдаемые изменения концентрации становятся все менее выраженными — концентрация Нсу на каждом сроке ТЛМ Мtx ниже, чем в предыдущем курсе (рис. 6); каждый последующий курс начинался с более низкого значения Нсу, чем предыдущий. Причиной этого может быть остаточное действие лейковорина, а также активация альтернативных путей метаболизма Нсу (бетаинового, а также цистатионового пути, который преимущественно развит в почках).

Статистически достоверная разница в образовании Нсу была выявлена между 1-м и 4-м, 6-м, 7-м, 8-м курсами, а также между 5-м и 7-м, 8-м курсами ВД Мtx. Обнаружено, что в течение первых 4 курсов концентрация Нсу снижалась. Пятый курс имел особенности: характеризовался большими значениями (чем на 2–4-м курсах) концентрации Нсу на всех сроках ТЛМ — в среднем в 1,5 раза, но не достигающими значений концентрации Нсу 1-го курса. Шестой, 7-й и 8-й курсы также характеризовались последовательным снижением концентрации Нсу в ключевые часы мониторинга.

Площадь под фармакокинетической кривой изменения концентрации Нсу ($H_{cy}AUC$) также показала тенденцию к снижению от курса к курсу. Это отражает снижение накопления Нсу в ответ на последовательное проведение курсов терапии ВД Мtx (табл. 4). После перерыва в терапии $H_{cy}AUC$ увеличивалась, не достигая изначальных значений, а затем постепенно снижалась. При этом $MtxAUC$ от курса к курсу оставалась неизменной, т. е. общее воздействие препарата на организм количественно не изменялось. Эти данные свидетельствуют о том, что общее накопление Нсу ($H_{cy}AUC$) является фармакодинамическим показателем, который линейно увеличивается в ответ на введение Мtx. Коэффициент корреляции (r) между концентрациями Мtx и Нсу составил 0,87.

Для АЛТ, АСТ, ЛДГ также были определены статистически значимые корреляции с концентрацией Нсу — 0,98; 0,86; 0,95 соответственно. Полученные нами данные по значимым корреляциям между концентрацией Нсу и гепатотоксичностью согласуются с данными литературы [18]. При этом необходимо отметить, что вышеназванное исследование было выполнено у больных с острым лимфобластным лейкозом

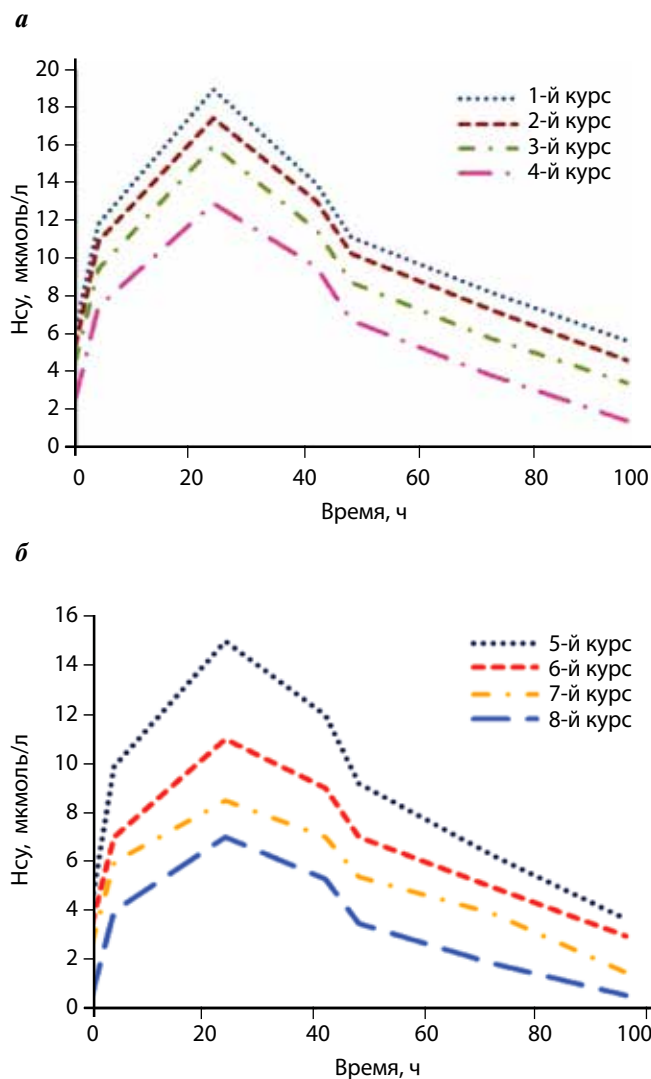


Рис. 6. Изменение концентрации Нсу с 1-го по 4-й курс (а) и с 5-го по 8-й курс (б) терапии ВД Мtx

и лимфомой Беркитта, которые получали значительно меньшие дозировки Мtx (1 и 3 г/м²), количество пациентов также было значительно меньше.

Заключение

Таким образом, Нсу метаболически взаимосвязан с Мtx — чем выше концентрация Мtx, тем большее количество Нсу выбрасывается в кровь. Нсу может служить маркером эффективности подавления трансформации фолатов. При замедленном выведении Мtx

Таблица 4. AUC для Нсу и Мtx на разных курсах терапии ВД Мtx

Показатель	Номер курса							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$MtxAUC$	12891 ± 523	11692 ± 610	12781 ± 534	11989 ± 470	12678 ± 497	11639 ± 617	11595 ± 568	11789 ± 612
$H_{cy}AUC$	$812,2 \pm 70,4$	$689,5 \pm 67,6$	$518,3 \pm 53,8$	$428,3 \pm 47,2$	$718,9 \pm 55,1$	$578,1 \pm 45,1$	$318,7 \pm 56,1$	$228,3 \pm 47,2$

уровень Нсу в крови значительно повышается, что также свидетельствует в пользу того, что он может служить маркером фармакодинамического воздействия ВД Мtx. С каждым последующим курсом ВД Мtx выброс Нсу в сыворотку снижается. Можно предположить, что Нсу начинает утилизироваться по другим метаболическим путям — бетаиновому, цистатионовому, и за счет этого вносит свой вклад в токсичность Мtx.

Из вышесказанного следует, что АЛТ, АСТ, ЛДГ являются неспецифическими маркерами токсичности Мtx и не отражают его токсичность с точки зрения механизма действия, а также его эффективность. Нсу является избирательным биохимическим маркером токсичности Мtx и может служить предиктором развития нарушений выведения Мtx, тем самым соответствуя всем критериям современного подхода к выбору биомаркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов А.В. Терапевтический лекарственный мониторинг. Качественная клиническая практика 2002;(1):78–88. [Sokolov A. V. Therapeutic Drug Monitoring. Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Good Clinical Practice 2002;(1):78–88. (In Russ.)].
2. Ghiculescu R. A. Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. Aust Prescr 2008;31:41–4.
3. Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs. Br J Clin Pharmacol 1999;47(2):131–43.
4. Мирошниченко И. И. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств: Практическое руководство. М.: Медицинское информационное агентство, 2011. 416 с. [Miroshnichenko I. I. Rational dosage and drug monitoring: Practical guide. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2011. 416 p. (In Russ.)].
5. Bacci G., Briccoli A., Longhi A. et al. Treatment and outcome of recurrent osteosarcoma: experience at Rizzoli in 235 patients initially treated with neoadjuvant chemotherapy. Acta Oncol 2005;44(7):748–55.
6. Копосов П. В., Ковалев В. И., Ковалев Д. В. Профилактика и лечение осложнений химиотерапии злокачественных опухолей у детей: современные подходы. Руководство для врачей. М.: Клевер Принт, 2002. С. 73–8. [Koposov P. V., Kovalev V. I., Kovalev D. V. Prevention and treatment of malignant tumours chemotherapy complications in children: modern approaches. Physician's Guide. Moscow: Klever Print, 2002. Pp. 73–8. (In Russ.)].
7. Crews K. R., Liu T., Rodriguez-Galindo C. et al. High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. Cancer 2004;100(8):1724–33.
8. Bacci G., Ferrari S., Longhi A. et al. Delayed methotrexate clearance in osteosarcoma patients treated with multiagent regimens of neoadjuvant chemotherapy. Oncol Rep 2003;10(4):851–7.
9. Hempel L., Misselwitz J., Fleck C. et al. Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. Med Pediatr Oncol 2003;40(6):348–54.
10. Broxson E., Stork L., Allen R. et al. Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusions. Cancer Res 1989;49(21):5879–83.
11. Rühls H., Becker A., Drescher A. et al. Population PK/PD model of homocysteine concentrations after high-dose methotrexate treatment in patients with acute lymphoblastic leukemia. PLoS One 2012;7(9):1–8.
12. Sterba J., Dusek L., Demlova R., Valik D. Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. Clin Chem 2006;52(4):692–700.
13. Refsum H., Wesenberg F., Ueland P. M. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. Cancer Res 1991;51(3):828–35.
14. Refsum H., Ueland P., Kvinnsland S. Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine. Cancer Res 1986;46(10):5385–91.
15. Refsum H., Smith A. D., Ueland P. M. et al. Homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem 2004;50(1):3–32.
16. Valik D., Sterba J., Bajciová V., Demlova R. Severe encephalopathy induced by the first but not the second course of high-dose methotrexate mirrored by plasma homocysteine elevations and preceded by extreme differences in pretreatment plasma folate. Oncology 2005;69(3):269–72.
17. Holmboe L., Andersen A. M., Mørkrid L. et al. High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. Br J Clin Pharmacol 2011;73(1):106–14.
18. Watanabe K., Heike T., Kubota M. et al. Plasma homocysteine, methionine and S-adenosylhomocysteine levels following high-dose methotrexate treatment in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia or Burkitt lymphoma: association with hepatotoxicity. Leuk Lymphoma 2013;3(1):1–5.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Успехи молекулярной онкологии», следует руководствоваться **обновленными 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 языке, 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 — 1500–5000 знаков с пробелами. Количество **ключевых слов** должно составлять от 10 до 50.

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.

- При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания.

- При ссылке на **авторефераты диссертаций** указывают также полное название работы, вид диссертации (докторская или кандидатская), год и место издания.

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

- 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 виде.

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.



Издательский дом «АБВ-пресс» специализируется на выпуске периодической научной медицинской литературы, книгопечатной продукции, создании и поддержке сайтов медицинского направления

НАШИ ЖУРНАЛЫ и ГАЗЕТЫ



НАШИ КНИГИ



Книги и наши издания можно заказать и приобрести в редакции по адресу:
г. Москва, Каширское ш., д. 24, стр. 15
и по телефону:
+7 (499) 929-96-19.
Адрес электронной почты:
abv@abvpress.ru

НАШИ САЙТЫ



www.abvpress.ru



www.oncoproct.ru



www.roou.ru



www.hnonco.ru



www.netoncology.ru



www.urotoday.ru



www.neuromuscular.ru



www.breastcancersociety.ru

