

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Молекулярно-генетические
аспекты патогенеза
гепатоцеллюлярной карциномы*

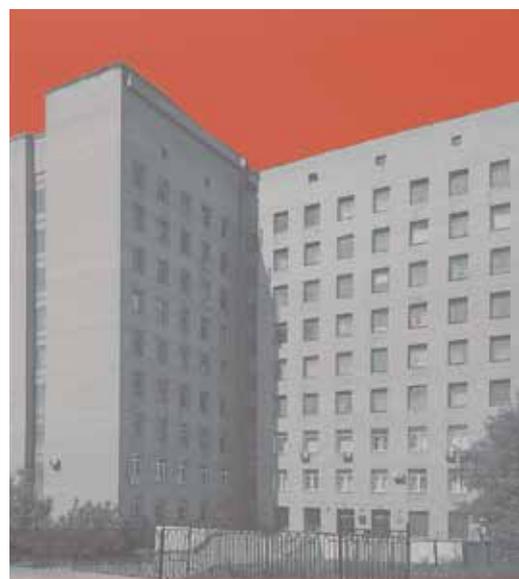
*Циклофилин А:
строение и функции*

*Экспрессия гена HMGA2
и микроРНК-221 в узлах
щитовидной железы*

*Ранняя диагностика
при наследственном диффузном
раке желудка*

*Гистогенез опухоли почечной
капсулы мышей, индуцированной
1,2-диметилгидразином*

ТОМ 4 № 4
2017



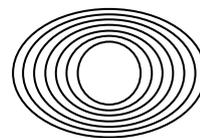
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

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

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

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

4 ТОМ 4
'17

Учредители:

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

Адрес редакции:

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

Принем статей: онлайн на сайте

<http://umo.abvpress.ru/jour>

или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор Н.В. Жукова

Корректор Т.Н. Помилуйко

Дизайн Е.В. Степанова

Верстка О.В. Гончарук

Служба подписки и распространения

И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,

base@abvpress.ru

Руководитель проекта

Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,

kuznetsov@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе по надзору

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

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

**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.**

**В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN: 2313-805X (Print)

ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.
2017. Том 4. № 4. 1–52

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

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

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

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

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

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

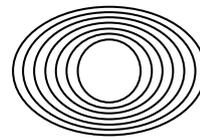
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

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

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

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



**N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia**

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

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

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

EXECUTIVE EDITOR

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

FOUNDED IN 2014

4 Vol. 4
'17

Founders: N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru
Article submission: on-line
at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader T.N. Pomilujko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

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

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

*Technologies, and Mass Media
(III No. ФС77-57560
dated 08 April 2014).*

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

**The editorial board is not responsible
for advertising content.**

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

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2017. Vol. 4
No. 4. 1—52

© PH "ABV-Press", 2017

Pressa Rossii catalogue index:
93562

Printed at Mediicolor LLC

1,000 copies

EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

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

Imyanitov Eugeny N., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sergeeva Natalia S., *PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

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

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

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

Tcherdyntseva Nadezhda V., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)*

EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Kopin Boris P., *MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ*А.С. Макарова***Молекулярно-генетические аспекты патогенеза гепатоцеллюлярной карциномы и современные возможности лекарственной терапии 8***А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский***Циклофилин А: строение и функции 17****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ***С.Е. Титов, М.К. Иванов, Е.В. Цивликова, М.С. Ганжа, Е.С. Малахина, А.В. Малек, Т.Л. Полоз, С.П. Шевченко, Н.Н. Колесников***Анализ относительной экспрессии гена *HMGA2* и онкогенной микроРНК-221 в цитологических препаратах, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы 24***Л.Н. Любченко, М.Г. Филиппова, О.А. Анурова, П.Б. Назлиев, И.С. Стилиди, М.М. Давыдов***Ранняя диагностика и тотальная гастрэктомия при наследственном диффузном раке желудка 32***О.В. Морозова, Е.Е. Антошина, В.Н. Манских***К вопросу о гистогенезе опухоли почечной капсулы, индуцированной 1,2-диметилгидразином у мышей СВА 37***Д.Б. Казанский, М.С. Вагида, Ю.Ю. Силаева, А.А. Калинина, М.А. Замкова, Л.М. Хромых, Н.А. Персиянцева, Л.Х. Джолохава***Функциональный потенциал клеток памяти CD8⁺ в условиях лимфопении, вызванной введением гидрокортизона 42****ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 49**

REVIEWS

A.S. Makarova

Molecular genetic aspects of hepatocellular carcinoma pathogenesis and current options of drug therapy 8

A.A. Kalinina, L.M. Khromykh, D.B. Kazansky

Cyclophilin A: structure and functions 17

EXPERIMENTAL REPORTS

S.E. Titov, M.K. Ivanov, E.V. Tsivlikova, M.S. Ganzha, E.S. Malakhina, A.V. Malek, T.L. Poloz, S.P. Shevchenko, N.N. Kolesnikov

Analysis of relative expression of the *HMGA2* gene and oncogenic microRNA-221 in cytological slides obtained by a fine-needle aspiration biopsy of the thyroid nodules 24

L.N. Lyubchenko, M.G. Filippova, O.A. Anurova, P.B. Nazliev, I.S. Stilidi, M.M. Davydov

Early diagnostics and total gastrectomy of hereditary diffuse gastric cancer 32

O.V. Morozova, E.E. Antoshina, V.N. Manskikh

About renal capsule tumour histogenesis, induced by 1,2-dimethylhydrazine in CBA mice 37

D.B. Kazansky, M.S. Vagida, Yu.Yu. Silaeva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, L.M. Khromykh, N.A. Persiyantseva, L.Kh. Jolokhava

Functional capacity of memory cells CD8⁺ under lymphopenia induced by injection of hydrocortisone. 42

INFORMATION FOR AUTHORS 49

Молекулярно-генетические аспекты патогенеза гепатоцеллюлярной карциномы и современные возможности лекарственной терапии

А.С. Макарова

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Сергеевна Макарова a.makarova.work@gmail.com

Опухоли печени являются одними из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований и занимают 2-е место по числу летальных исходов. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — основная форма опухолей печени, которая выявляется чаще всего на поздних стадиях. Развитие ГК — результат накопления разнообразных соматических молекулярных нарушений. Хронические заболевания печени и другие этиологические факторы развития ГК приводят к многочисленным и гетерогенным генетическим и эпигенетическим нарушениям, определяющим разнообразные изменения экспрессии генов в ГК. Молекулярная гетерогенность ограничивает эффективность таргетной терапии, которая является основным способом лечения ГК на поздних стадиях заболевания.

В настоящем обзоре рассматриваются основные генетические и эпигенетические нарушения, наблюдаемые в ГК; приведены сведения об исследованиях транскриптома ГК и способах системно-биологического анализа данных. Представлена актуальная информация о вариантах таргетной терапии и иммунотерапии данного типа опухолей.

Ключевые слова: гепатокарцинома, секвенирование нового поколения, GSEA, SNEA, таргетная терапия, иммунотерапия

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-8-16

Molecular genetic aspects of hepatocellular carcinoma pathogenesis and current options of drug therapy

A.S. Makarova

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Liver cancer is widespread neoplasm type that ranks second among the causes of cancer-related mortality worldwide. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the main form of liver cancer generally detected at advanced stages in most patients. HCC development is a result of accumulation of various somatic molecular alterations. Different HCC etiology and chronic liver diseases cause numerous and heterogeneous genetic and epigenetic aberrations that determine diverse gene expression alterations in HCC. Molecular heterogeneity limits the efficacy of targeted therapy that is currently the essential approach for advanced stage HCC treatment.

The present review considers the main genetic and epigenetic alterations detected in HCC, results of transcriptomic investigations and systems biology analysis of the data. Up-to-date information on application of targeted drugs and immune checkpoint inhibitors in HCC therapy are discussed.

Key words: hepatocarcinoma, next-generation sequencing, GSEA, SNEA, targeted therapy, immunotherapy

Введение

Согласно международной статистике опухоли печени входят в число 10 наиболее распространенных форм злокачественных новообразований и занимают в большинстве стран мира 2-е место по числу случаев летальных исходов [1]. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) относится к опухолям эпителиального происхождения и представляет собой основную форму злокачественных новообразований печени, которая возникает из гепатоцитов [2]. ГК выявляется в основном на поздних стадиях и отличается агрессивным течением, что обуславливает крайне неблагоприятный прогноз [3, 4].

У пациентов на фоне хронических вирусных гепатитов или цирроза возникает 80–90 % ГК [5]. Основными причинами цирротического поражения печени, которое стимулирует гепатоканцерогенез, являются инфекции, вызванные вирусами гепатита В (HBV) или гепатита С (HCV), алкогольная болезнь печени [3]. Другие факторы риска развития ГК — неалкогольный стеатогепатит, стеатогепатоз и неалкогольная жировая болезнь печени, наследственный гемохроматоз, метаболический синдром, диабет, курение, наличие в пище афлатоксина В1 [6].

Гепатоканцерогенез обусловлен длительным воздействием факторов риска, нарушающих активность

сигнальных путей и транскрипционных регуляторов. Эти события приводят к изменению экспрессии генов в гепатоцитах и их опухолевой трансформации. В большинстве случаев ГК развивается в результате хронического повреждения печени, которое стимулирует окислительный стресс и воспаление, способствующие мутагенезу, активации онкогенов, инактивации опухолевых супрессоров и конститутивной активации сигнальных путей рецепторов факторов роста [4]. Эти события нарушают контроль деления клеток и вызывают ингибирование апоптоза. Ускоренная пролиферация трансформированных клеток приводит к формированию первичного опухолевого узла [3, 4]. Следующим этапом гепатоканцерогенеза является прогрессия опухоли, при которой происходит постепенное приобретение опухолью более злокачественного фенотипа, характеризующегося автономным и агрессивным ростом, которому способствует интенсивное прорастание сосудов в опухолевый узел под действием проангиогенных факторов. Прогрессирование ГК, как и других злокачественных новообразований, также сопровождается эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), при котором опухолевые клетки приобретают подвижность и способность перестраивать внеклеточный матрикс, что приводит к их инвазии в прилежащие ткани и опосредует формирование вторичных опухолевых узлов — метастазов [3, 7–9].

На молекулярном уровне патогенеза формирования ГК — результат накопления разнообразных соматических молекулярных нарушений. Отличительной особенностью ГК является высокая гетерогенность молекулярных изменений [4]. Это вызвано различными этиологическими факторами развития ГК и сопутствующими хроническими заболеваниями печени, которые приводят к многочисленным и разнородным генетическим и эпигенетическим нарушениям, определяющим многообразие профилей экспрессии генов в ГК [10]. По данным масштабного сравнительного исследования профиля мутаций в 30 различных типах рака, ГК отличается высокой частотой соматических мутаций и разнообразием их паттернов [11].

Молекулярная гетерогенность, характерная для ГК, ограничивает эффективность таргетной терапии [3], которая является основным способом лечения ГК на поздних стадиях заболевания [4]. В настоящее время для лечения ГК одобрено несколько мультитаргетных препаратов, однако даже для первого препарата данного класса (сорафениба) терапевтические маркеры еще не валидированы [4]. В связи с этим учет молекулярных нарушений, характерных для каждого конкретного случая ГК, представляется пока единственным перспективным возможным подходом для предсказания потенциальной чувствительности опухолей к лекарственным препаратам. В настоящем обзоре рассмотрены и обобщены современные данные об основных генетических и эпигенетических нарушениях,

наблюдаемых в ГК и обеспечивающих формирование злокачественного фенотипа этого типа опухолей.

Основные генетические нарушения при гепатоканцерогенезе

Огромный прорыв в исследовании спектра молекулярных нарушений в опухолях за последние годы достигнут благодаря развитию технологий массового параллельного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) [12]. Секвенирование ДНК, выделенных из опухолевых тканей и соответствующих им образцов прилежащей нормальной ткани, и сравнение полученных данных с референсными последовательностями генома человека позволили приступить к выявлению индивидуальных отличий ДНК пациентов: обнаружить соматические мутации в первичных опухолях или их метастазах [13].

Исследование генетических изменений при гепатоканцерогенезе показало, что для ГК характерны большое число соматических мутаций (однонуклеотидные замены, небольшие инсерции и делеции), изменение копийности генов (амплификации, потери гетерозиготности) и хромосомные перестройки (делеции, инверсии, дупликации и транслокации). Методы полноэкзомного и полногеномного секвенирования позволяют с высокой точностью определить конкретные генетические нарушения в клетках ГК [14].

Ключевые молекулярные нарушения, характерные для патогенеза ГК, выявлены для генов, кодирующих компоненты теломеразы, регуляторы клеточного цикла и модификации хроматина, компоненты сигнальных путей опухолевого супрессора p53, Wnt/ β -катенин и каскада, регулируемого фосфатидилинозитол-3-киназой (phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K) и mTOR (mammalian target of rapamycin), — PI3K/Akt/mTOR [3, 4, 14]. По данным масштабного исследования результатов полноэкзомного секвенирования 243 пар образцов ГК и соответствующих им образцов ткани печени, описано изменение активности 11 молекулярных путей, определяющих регуляцию длины теломер, контроль клеточного цикла, гепатоцитарную дифференцировку, эпигенетическую регуляцию, ремоделирование хроматина, ответ на окислительный стресс, а также внутриклеточных сигнальных путей трансформирующего фактора роста β (TGF β), PI3K/Akt/mTOR, Wnt/ β -катенин, каскада митогенактивированных киназ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) и пути JAK/STAT, регулируемого Янус-киназами (Janus kinase, JAK) и транскрипционными факторами STAT (signal transducer and activator of transcription) [15].

Как показывают результаты исследований генетических изменений в ГК, среди наиболее часто амплифицированных генов большую группу составляют гены регуляторов пролиферации: нерцепторной тирозинкиназы *ABL2* (abelson tyrosine-protein kinase 2), рецептора фактора роста гепатоцитов HGF — c-Met (*MET*), c-Мус (*MYC*), циклина D1 (*CCND1*) и *RPS6KB1*, ген

рибосомальной протеинкиназы *S6K1* (ribosomal protein S6 kinase beta 1). Гены ингибиторов пролиферации $p16^{\text{INK4a}}$ (*CDKN2A*), $p15$ (*CDKN2B*) и pRb (*RBI*), наоборот, часто делетированы в клетках ГК [4, 14, 16].

Наиболее часто в образцах ГК выявляются нарушения гена *TERT*, который кодирует каталитическую субъединицу теломеразы (telomerase reverse transcriptase), фермента, обеспечивающего поддержание длины теломерных участков хромосом и отмену репликативного старения. Мутации в промоторе *TERT* обнаруживаются в 54–60 % случаев ГК, амплификация гена описана в 5–10 % случаев [4, 16]. Дисфункция теломеразы наиболее характерна для ГК, ассоциированных с инфекциями HBV [17].

Другими распространенными геномными нарушениями в ГК являются инактивирующие мутации или делеции гена опухолевого супрессора $p53$ (*TP53*) (12–48 % случаев) [15, 16, 18].

Активация сигнального пути Wnt/ β -катенин, характерная для ГК, связана с активирующими мутациями в гене β -катенина (*CTNNB1*), которые обнаруживаются примерно в трети исследованных случаев, при этом они чаще встречаются в высокодифференцированных опухолях, не ассоциированных с инфекцией HBV. Инактивирующие мутации генов негативных регуляторов сигнального пути Wnt/ β -катенин – белка аденоматозного полипозного колита (adenomatous polyposis coli protein, *APC*) и аксина 1 (*AXIN1*) – также выявляются в 10 и 1–2 % случаев ГК соответственно [4]. Следует отметить, что в образцах ГК мутации *TP53* и *CTNNB1* преимущественно взаимоисключающие [3].

В подавляющем большинстве работ по анализу данных полногеномного или полноэкзомного секвенирования ГК выявлены мутации в генах регуляторов реорганизации хроматина: повреждающие мутации компонентов комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF (SWI1/SUCROSE NON-FERMENTABLE) и гомозиготные делеции генов семейства ДНК-связывающих белков AT-rich interactive domain, *ARID* (*ARID1A*, *ARID1B* и *ARID2*) [15–17, 19, 20]. Эти молекулы могут выполнять опухолесупрессорную функцию: для них описана ключевая роль в изменении нуклеосомной укладки хроматина, оказывающей определяющее влияние на процессы репарации ДНК, пролиферации и дифференцировки [3].

В ГК часто (до 50 % случаев) выявляются мутации эпигенетических регуляторов, таких как лизин-метилтрансферазы (mixed lineage leukemia, MLL) *MLL1*, *MLL3* и *MLL4*, и белки, распознающие модификации гистонов, – BPTF (bromodomain PHD finger transcription factor) и RNF20 (RING finger protein 20) [15, 17, 18].

Активация каскадов Ras/MAPK и PI3K/Akt/mTOR, характерная для ГК, обусловлена амплификацией хромосомных локусов, содержащих гены факторов роста фибробластов *FGF3*, *FGF4* и *FGF19* (наблюдается в среднем в 5 % образцов), а также в 1–3 % случаев связана с инактивирующей мутацией фосфатазы

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), модулирующей активность PI3K [4].

В ГК также (в 2–8 % случаев) происходит изменение активности сигнальных путей, определяющих ответ на окислительный стресс, вызванный активирующими мутациями гена, кодирующего транскрипционный фактор NFE2L2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) и регулирующего метаболические процессы, или повреждающими мутациями взаимодействующей с ним E3-убиквитинлигазы KEAP1 (kelch-like ECH-associated protein 1). Дисфункция NFE2L2 способствует опухолевой трансформации вследствие изменения транскрипционной программы клеток, которая определяет их выживаемость в условиях стресса [3, 4].

Таким образом, результаты полноэкзомного и полногеномного секвенирования клинических образцов ГК демонстрируют широкий спектр соматических мутаций, для подавляющего большинства которых характерна невысокая частота встречаемости, что определяет значительную генетическую гетерогенность ГК.

Нарушения механизмов эпигенетической регуляции в гепатоцеллюлярной карциноме

Среди изменений эпигенетической регуляции при гепатоканцерогенезе выделяют нарушения ковалентных модификаций гистонов, общее снижение уровня метилирования генов, гиперметилирование генов опухолевых супрессоров, изменение экспрессии хроматинмодифицирующих ферментов, микроРНК и длинных некодирующих РНК [21, 22]. Гипометилирование ДНК вызывает хромосомную нестабильность, активацию онкогенов и коррелирует с неблагоприятным прогнозом развития заболевания. Указанные эпигенетические нарушения ассоциированы с прогрессированием ГК и могут служить потенциальными прогностическими маркерами для этого типа опухолей [22].

В ГК часто происходит метилирование генов опухолевых супрессоров $p53$, $p73$ и *WT1* (Wilm's tumor suppressor), генов регуляторов клеточного цикла: pRb , транскрипционного фактора *E2F1* и ингибиторов циклинзависимых киназ – $p27$, $p21^{\text{CIP1/WAF1}}$, $p16^{\text{INK4a}}$ и $p15$, а также важнейшего эпителиального маркера E-кадгерина [22].

Нарушения эпигенетической регуляции при гепатоканцерогенезе исследуют с применением технологий NGS. При анализе профилей метилирования генов в 16 образцах ГК методом HMST-seq (hydroxymethylation and methylation sensitive tag sequencing) было выявлено гиперметилирование промоторов транскрипционных факторов *TCF21* (transcription factor 21), *EOMES* (eomesodermin homolog), *ATF5* (activating transcription factor 5) и регулятора клеточной адгезии дерматопонтина *DPT* (dermatopontin). Их предполагаемое опухолесупрессорное действие было подтверждено в опытах на культурах ГК *in vitro* [23]. Методом бисульфитного секвенирования (liquid hybridization capture-based bisulfite sequencing, LHC-BS) в 8 парных образцах ткани

ГК и неопухоловой ткани печени обнаружены районы дифференциального метилирования в промоторах 12 генов, экспрессия которых значительно изменилась в ГК. Проведенная аналогичным образом валидация выявленных изменений на выборке из 78 парных образцов ГК показала, что для нескольких дифференциально экспрессированных (ДЭ) генов отмечается гиперметилирование в промоторах (отмечено для гена компонента TGF β -регулируемого каскада SMA/MAD-родственного белка SMAD6) или гипометилирование (обнаружено в промоторе гена провоспалительного хемокина *CCL20* (C-C motif chemokine 20)) [24].

Результаты проведенного A. Villanueva и соавт. масштабного исследования нарушений метилирования генов в ГК методом пиросеквенирования ДНК из 221 образца ГК и 10 образцов неопухоловой ткани печени показали, что в ГК с высокой частотой происходит нарушение метилирования генов, для которых описана роль в патогенезе ГК: белка-ингибитора Ras *RASSF1* (Ras association domain-containing protein 1), инсулиноподобного фактора роста *IGF2* и *APC*, а также в онкогенах, характерных для других типов опухолей, например *NOTCH3* [25]. При исследовании профилей метилирования ДНК из 196 образцов ГК по данным базы The Cancer Genome Atlas (TCGA) выявлено, что практически в половине образцов ГК наблюдается гиперметилирование генов *IDH1* и *IDH2* [16], кодирующих изоформы изоцитратдегидрогеназы, нарушение функции которых приводит к накоплению 2-оксоглутарата, участвующего в регуляции реакций метилирования [26].

Изменение экспрессии некодирующих микроРНК, важных эпигенетических регуляторов, которые посттранскрипционно контролируют стабильность матричной РНК или эффективность трансляции, характерно для патогенеза ГК. Выявлено более 20 различных микроРНК, нарушение экспрессии которых влияет на пролиферативную активность клеток культур ГК, их способность к миграции и инвазии, а также, по данным опытов *in vivo*, связано с изменением туморогенности и метастатического потенциала опухолевых клеток [22].

Изменение экспрессии в ГК некоторых микроРНК, для которых показана функциональная значимость, было также продемонстрировано с помощью технологий NGS. Результаты исследования профиля экспрессии микроРНК на больших выборках образцов ГК из базы TCGA позволили описать активацию экспрессии кластера микроРНК-17–92, обладающих проопухоловым действием [27], а также снижение экспрессии опухолесупрессорных микроРНК-22 [28] и микроРНК-122 [16]. В клеточных культурах ГК и опухолевых образцах нередко отмечаются повышение экспрессии онкогенной микроРНК-155 [29] и подавление экспрессии опухолесупрессорных микроРНК семейства let-7 [30], микроРНК-486-5p [31] и микроРНК-99a [32].

Изменение экспрессии генов при гепатоканцерогенезе

Генетические и эпигенетические нарушения, происходящие при канцерогенезе, вызывают масштабные изменения транскрипционной программы, поэтому определение генов, экспрессия которых значительно изменилась в опухолевой ткани, т. е. ДЭ-генов, позволяет более детально охарактеризовать значение молекулярных нарушений в формировании фенотипа опухолевых клеток.

Основной технологией для исследования изменений экспрессии генов в опухолевых клетках до распространения высокопроизводительного секвенирования был метод гибридизации с микрочипами. Результаты исследований изменений транскриптома клеток ГК, выполненных с использованием этого метода, позволили охарактеризовать 2 основных молекулярных класса ГК – пролиферативный и непролиферативный. Проллиферативный класс характеризуется активацией каскадов, регулируемых Ras, mTOR и амплификацией локуса *FGF19*. В данный класс входит большинство ГК, ассоциированных с инфекцией HBV. Ряд исследователей выделяют в пролиферативном классе 2 группы: группу, в которой наблюдается активация TGF β -регулируемого пути и каскада Wnt/ β -катенин, и группу образцов, для которых характерен транскриптомный профиль клеток-предшественников гепатоцитов. Последняя группа характеризуется низким уровнем дифференцировки, сосудистой инвазией, экспрессией маркера гепатобластов EpCAM, гиперэкспрессией α -фетопротейна (АФП) и активацией каскадов Notch и IGF2. ГК, входящие в непролиферативный класс, отличаются средним или высоким уровнем дифференцировки, низким уровнем секреции АФП, ассоциированы с инфекцией HCV или алкогольной болезнью печени, по транскриптомному профилю в ГК данного типа отмечается активация сигнального пути Wnt/ β -катенин [4, 33].

Данные исследования изменений экспрессии генов в клинических образцах ГК методом гибридизации комплементарной ДНК (кДНК) с микрочипами позволили обнаружить ряд сигнатур, ассоциированных с прогрессированием ГК, метастазированием и коррелирующих с отдаленными результатами лечения пациентов [33].

Метод гибридизации с микрочипами обладает рядом недостатков: ограниченное число последовательностей зондов для детекции не может обнаруживать последовательности, которые не входят в состав используемой платформы. Технология NGS РНК (RNA-Seq) имеет больший потенциал для определения изменений транскриптома в опухолевых клетках, поскольку позволяет детектировать нарушения экспрессии генов и разных видов некодирующих РНК, идентифицировать ранее не исследованные последовательности транскриптов (новые сплайс-формы и химерные белки) и проводить поиск соматических мутаций. Эти особенности технологии RNA-Seq позволяют рассматривать

ее как наиболее перспективный метод для комплексного изучения нарушения транскрипционной программы опухолевых клеток [12].

В первом исследовании транскриптомных изменений в ГК, проведенном Q. Huang и соавт. методом RNA-Seq при полнотранскриптомном секвенировании 10 пар образцов ГК и неопухолевой ткани печени пациентов, инфицированных HBV, было выявлено 1378 ДЭ-генов и 24 338 ДЭ-экзонов, соответствующих генам и изоформам регуляторов пролиферации, метаболизма клеток и иммунного ответа [34].

Результаты исследования транскриптома на разных стадиях развития вирусассоциированных ГК (диспластические узелки и опухолевые узлы различной степени злокачественности), выполненное с использованием RNA-Seq, позволили описать изменения транскриптома, происходящие при прогрессировании ГК. Ранние изменения транскрипционной программы клеток при гепатоканцерогенезе немногочисленны и однородны: изменяется экспрессия 100–200 генов – участников метаболизма глутатиона, регуляции ответа на окислительный стресс, регуляторов апоптоза, клеточного цикла и иммунного ответа. На поздних этапах прогрессирования ГК наблюдаются более масштабные генетические нарушения, которые вызывают активацию сигнальных путей TGF β , Wnt/ β -катенин, Notch, HGF/c-Met и фактора роста эндотелия (VEGF), опосредующих реализацию программы ЭМП [35].

При анализе данных полнотранскриптомного секвенирования 50 парных образцов опухолевой и прилегающей ткани печени из базы TCGA в ГК была выявлена гиперэкспрессия широкого спектра генов, кодирующих ключевые регуляторы клеточного цикла: циклины A2, B1, B2 и E1 и циклинзависимую киназу CDK1. Среди генов, экспрессия которых значительно снизилась в опухолевой ткани, преобладали гены ферментов метаболизма липидов и цитохромов P450 [36].

Системно-биологический анализ транскриптомных изменений при гепатоканцерогенезе

Изменение транскрипционной программы опухолевых клеток часто связано с нарушением регуляции транскрипции генов, вызванным мутациями транскрипционных факторов, их кофакторов или регуляторов организации хроматина [37]. Определение характерных для конкретной опухоли паттернов экспрессии генов и их возможных регуляторов, а также выявление различий в экспрессии генов между опухолью и нормальной тканью имеет терапевтическую значимость [38, 39].

Одним из основных методов определения различий между группами генов является анализ перепредставленности генов в функциональных группах (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA), алгоритм которого оценивает сходство изменений экспрессии генов между двумя состояниями [40]. Таким способом можно обнаружить отличия профиля экспрессии генов от нормы при патологии или различные паттерны экспрессии

генов в разных типах и подтипах опухолей [41]. При этом использование определенных групп генов с известными функциями или генов, регулирующих определенный процесс (так называемые априорные знания, хранящиеся в ряде баз данных (БД)), позволяет упростить биологическую интерпретацию наблюдаемых изменений и охарактеризовать их, определив, к каким процессам или сигнальным каскадам они относятся [40]. Существующие общедоступные БД, содержащие информацию о генах и белках, включая их функциональную аннотацию, представлены интернет-ресурсами Gene Ontology (GO), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), NCBI Gene и Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB). БД межмолекулярных взаимодействий включают как общедоступные – Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG), BioCarta, Reactome и Molecular Signatures Database (MSigDB), так и коммерческие базы, интегрированные в среду для визуализации и анализа данных, например Ingenuity, TRANSFAC и ResNet [42]. Для анализа данных с помощью алгоритма GSEA широко используют приложения для работы в среде Cytoscape, в которые можно загружать аннотированные списки генов (например, с учетом информации GO) и экспериментальные данные по экспрессии генов [43]. Для интеграции и анализа биологических данных (в том числе изменений экспрессии генов) применяют также коммерческие программы (например, Ingenuity Pathways Analysis (IPA), Pathway Studio), которые имеют собственные БД молекулярных взаимодействий и аннотаций генов, на основе которых работает алгоритм GSEA [44, 45].

GSEA – распространенный метод анализа для исследования транскриптомных изменений при гепатоканцерогенезе. Изучение транскрипционных профилей ГК, полученных методом гибридизации кДНК с микрочипами, с использованием GSEA, реализованным в среде IPA, позволило установить соответствие паттернов ДЭ-генов с активацией проопухолевых сигнальных каскадов, стимулирующих пролиферацию клеток [34, 35] или обеспечивающих формирование злокачественного фенотипа при прогрессировании ГК – TGF β , Notch и HGF/c-Met [35]. При анализе данных полнотранскриптомного секвенирования парных образцов ГК и ткани печени из базы TCGA, проведенном с применением GSEA, выявлены группы гиперэкспрессированных генов, кодирующих компоненты сигнальных каскадов, регулирующих клеточный цикл, и генов со сниженной экспрессией, кодирующих компоненты метаболических путей [36]. Использование алгоритма GSEA при анализе данных полнотранскриптомного секвенирования парных образцов ГК и прилегающей ткани печени, полученных от пациентов, инфицированных HBV, позволило выделить группы ДЭ-генов с повышенной экспрессией, регулирующих клеточные обменные процессы [46].

Несмотря на высокую аналитическую значимость метода GSEA для сравнения групп генов, он обладает

существенным недостатком — зависимостью результатов анализа от наборов генов, по которым осуществляется поиск соответствий. Общедоступные БД, содержащие аннотации биологических функций молекул и группирующие их по соответствующим биологическим процессам (KEGG, GO, MSigDB), имеют ограниченный набор аннотаций или ориентированы на описание определенных групп процессов, например путей метаболизма, как KEGG [47].

Для анализа нарушений транскриптома опухолевых клеток, которые отличаются генетической разнообразностью, целесообразно использовать методы, не основанные на поиске по фиксированным наборам генов и, таким образом, не зависящие от количества представленной в базах информации об определенных функциональных группах генов. Таким методом является модификация GSEA — алгоритм Sub-Network Enrichment Analysis (SNEA), который реализован в среде Pathway Studio. SNEA по имеющейся в среде БД межмолекулярных взаимодействий выполняет поиск всех мишеней, известных для конкретного регулятора, и на основании полученной подсети (Sub-Network) в Pathway Studio строится каскад, отражающий регуляторные взаимодействия — связи регулятора экспрессии генов с его мишенями [45]. Объединение регуляторов, найденных в результате работы SNEA, в группы по функциям или принадлежности к определенным сигнальным каскадам позволяет упростить многомерные регуляторные сети и выделить основные группы регуляторов экспрессии генов, активация или дисфункция которых, вероятно, определяет развитие исследуемого патологического процесса [45, 47].

Для изучения молекулярных нарушений в ГК алгоритм SNEA, реализованный в Pathway Studio, был использован в работе L. Castillos и A. Yurjev, которые провели сравнение данных экспрессии генов в образце биопсийного материала ГК и нормальной ткани печени. Среди регуляторов ДЭ-генов в ГК выявлены лиганды каскадов рецептора эпидермального фактора роста EGFR (эпирегулин и гепаринсвязывающий эпидермальный фактор роста HB-EGF), тромбоцитарный фактор роста PDGF-D, а также индукторы ЭМП: Snail, Slug и ZEB1 [48].

Таргетная терапия гепатоцеллюлярной карциномы и иммунотерапия

К настоящему времени охарактеризовано множество путей внутриклеточной сигнализации, опосредующих опухолевую трансформацию и обеспечивающих прогрессирование ГК. Среди них ключевые регуляторы клеточного деления — пути, регулируемые p53 и pRb, каскады, контролирующие дифференцировку клеток (Wnt/ β -катенин, TGF β , Notch, Hedgehog), сигнальные пути, регулирующие пролиферацию и выживание клеток (IGF, HGF/c-Met, EGFR, PI3K/Akt/mTOR), каскады проангиогенных факторов роста (VEGF, FGF, PDGF) и путь NF- κ B, связанный с реализацией им-

мунного ответа [3]. Однако, несмотря на известный спектр активированных в ГК проопухолевых каскадов и наличие терапевтических возможностей их блокирования, характерная для ГК гетерогенность генетических нарушений и невысокая частота их встречаемости определяют сложность выбора вариантов молекулярно-направленной терапии и влияют на их эффективность. Поэтому применение мультитаргетных препаратов, оказывающих комплексное ингибирующее действие на различные онкогенные каскады, — наиболее интенсивно развиваемое направление лекарственной терапии ГК [49, 50].

По международным стандартам основным препаратом 1-й линии для лекарственной терапии ГК является мультикиназный ингибитор сорафениб [4]. Эффективность применения сорафениба основывается на широком спектре ингибирующего действия: он блокирует активность рецепторных тирозинкиназ VEGFR1/2/3, PDGFR β , c-Kit и киназ MAPK-каскада Raf-1 и B-Raf. Кроме того, для сорафениба описана регуляция активности STAT3, стимулирующая апоптотическую гибель опухолевых клеток [50]. Высокая генетическая гетерогенность ГК, фенотипическая пластичность опухолевых клеток и дублирующая активность других проопухолевых каскадов, нечувствительных к сорафенибу, объясняют невысокую эффективность терапии данным препаратом и развитие резистентности к нему [50]. Возможность развития устойчивости клеток ГК к сорафенибу может быть оценена по результатам анализа профиля экспрессии генов, характеризующих уровень дифференцировки клеток (тканеспецифические белки, компоненты межклеточных контактов, маркеры стволовых и мезенхимальных клеток), и генов компонентов сигнальных путей, опосредующих резистентность к действию препарата (Wnt/ β -катенин, TGF β , EGFR) [51].

В 2017 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) в качестве препарата для таргетной терапии ГК 2-й линии был одобрен структурный аналог сорафениба — регорафениб [52]. Профиль ингибиторного действия регорафениба перекрывается с профилем сорафениба [53], при этом регорафениб характеризуется большей специфичностью ингибирования киназ VEGFR1/2/3, PDGFR β , c-Kit, Raf-1 и B-Raf, а также ингибирующим действием в отношении рецепторной тирозинкиназы RET [54].

Вероятной альтернативой сорафенибу как препарату 1-й линии терапии ГК может стать мультикиназный ингибитор ленватиниб, специфичный в отношении блокирования активности рецепторов VEGFR1/2/3, FGFR1/2/3/4, PDGFR α , c-Kit и RET. Можно ожидать, что регистрация ленватиниба в качестве терапии 1-й линии ГК расширит возможности терапии неоперабельных случаев ГК [55].

В настоящее время проводится ряд испытаний вариантов молекулярно-направленной терапии ГК,

нацеленной на блокирование активности сигнальных путей, оказывающих проопухолевое действие. Клинические испытания III фазы проходят ингибиторы с антиангиогенным действием – апатиниб и рамусирумаб, блокирующие активность VEGFR2. Для лечения ГК II фазу клинических испытаний проходят галунисертиб, ингибитор рецептора TGF β T β R-1, и сочетание ингибитора mTOR темсиролимуса с сорафенибом [4].

Новым направлением в терапии ГК, развитие которого обусловлено отсутствием преобладающих драйверных молекулярных нарушений в данном типе опухолей, стало блокирование молекул контрольных точек регуляции иммунного ответа, в частности – ингибирование сигнального пути программируемой клеточной гибели, запускаемого рецептором PD-1 (Programmed cell Death protein 1). Активация PD-1 вызывает апоптоз цитотоксических лимфоцитов, что приводит к остановке иммунной реакции на опухолевые клетки. Пем-

бролизумаб (анти-PD-1 препарат) проходит III фазу клинических испытаний для лечения пациентов, у которых развилась устойчивость к сорафенибу [56]. Ниволумаб (анти-PD-1 препарат) также проходит III фазу клинических испытаний в качестве альтернативы сорафенибу [56] и в 2017 г. был утвержден FDA как препарат 2-й линии терапии ГК для пациентов, ранее получавших сорафениб [57].

Заключение

Типичная для ГК высокая гетерогенность молекулярных нарушений определила основные современные тенденции разработки направлений лекарственной терапии. Анализ индивидуальных профилей молекулярных изменений в образцах ГК может быть использован для оценки чувствительности опухолевых клеток к препаратам, выявления механизмов развития резистентности и в перспективе может служить повышению эффективности противоопухолевой терапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385(9963):117–71. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31833-0. PMID: 28919115.
2. Hamilton S.R., Aaltonen L.A. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2000.
3. Marquardt J.U., Andersen J.B., Thorgeirsson S.S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:653–67. DOI: 10.1038/nrc4017. PMID: 26493646.
4. Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18. PMID: 27158749.
5. Zhang D.Y., Friedman S.L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2012;56:769–75. DOI: 10.1002/hep.25670. PMID: 22378017.
6. Ghouri Y.A., Mian I., Rowe J.H. Review of hepatocellular carcinoma: epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog* 2017;16:1. DOI: 10.4103/jcar.JCar_9_16.eCollection 2017. PMID: 28694740.
7. Лазаревич Н.Л. Молекулярные механизмы прогрессии опухолей печени. *Успехи биологической химии* 2004;(44):365–418. [Lazarevich N.L. Molecular mechanisms of progression of liver tumors. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Successes of Biological Chemistry* 2004;(44): 365–418. (In Russ.)].
8. Aravalli R.N., Cressman E.N., Steer C.J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol* 2013;87(2):227–47. DOI: 10.1007/s00204-012-0931-2. PMID: 23007558.
9. Giannelli G., Koudelkova P., Dituri F., Mikulits W. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016;65(4):798–808. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.05.007. PMID: 27212245.
10. Ressler S., Budhu A., Wang X.W. Deciphering cancer heterogeneity: the biological space. *Front Cell Dev Biol* 2014;(2):12. DOI: 10.3389/fcell.2014.00012. PMID: 25364720.
11. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500(7463):415–21. DOI: 10.1038/nature12477. PMID: 23945592.
12. Макарова А.С., Кустова И.Ф., Лазаревич Н.Л. Методы массового параллельного секвенирования в идентификации молекулярно-генетических детерминант гепатоканцерогенеза. *Молекулярная медицина* 2015;(2):54–60. [Makarova A.S., Kustova I.F., Lazarevich N.L. Methods of next generation sequencing in the identification of molecular genetic determinants of hepatocarcinogenesis. *Molekulyarnaya meditsyna = Molecular Medicine* 2015;(2):54–60. (In Russ.)].
13. Xuan J., Yu Y., Qing T. et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* 2013;340:284–95. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.025. PMID: 23174106.
14. Shibata T., Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. *Gastroenterol Hepatol* 2014;11(6):340–9. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.6. PMID: 24473361.
15. Schulze K., Imbeaud S., Letouzé E. et al. Exome sequencing of hepatocellular

- carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* 2015;44:505–11. DOI: 10.1038/ng.3252. PMID: 25822088.
16. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell* 2017;169(7):1327–41.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.046. PMID: 28622513.
 17. Fujimoto A., Totoki Y., Abe T. et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 2012;44:760–4. DOI: 10.1038/ng.2291. PMID: 22634756.
 18. Totoki Y., Tatsuno K., Covington K.R. et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet* 2014;46(12):1267–73. DOI: 10.1038/ng.3126. PMID: 25362482.
 19. Guichard C., Amadeo G., Imbeaud S. et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:694–8. DOI: 10.1038/ng.2256. PMID: 22561517.
 20. Huang J., Deng Q., Wang Q. et al. Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2012;44:1117–21. DOI: 10.1038/ng.2391. PMID: 22922871.
 21. Herceg Z., Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res* 2011;727:55–61. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.04.001. PMID: 21514401.
 22. Wahid B., Ali A., Rafique S., Idrees M. New insights into the epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2017;2017:1609575. DOI: 10.1155/2017/1609575. PMID: 28401148.
 23. Gao F., Xia Y., Wang J. et al. Integrated analyses of DNA methylation and hydroxymethylation reveal tumor suppressive roles of ECM1, ATF5, and EOMES in human hepatocellular carcinoma. *Genome Biol* 2014;15(12):533. DOI: 10.1186/s13059-014-0533-9. PMID: 25517360.
 24. Gao F., Liang H., Lu H. et al. Global analysis of DNA methylation in hepatocellular carcinoma by a liquid hybridization capture-based bisulfite sequencing approach. *Clin Epigenetics* 2015;7:86. DOI: 10.1186/s13148-015-0121-1. PMID: 26300991.
 25. Villanueva A., Portela A., Sayols S. et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61(6):1945–56. DOI: 10.1002/hep.27732. PMID: 25645722.
 26. Lu C., Ward P.S., Kapoor G.S. *IDH* mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012;483(7390):474–8. DOI: 10.1038/nature10860. PMID: 22343901.
 27. Zhu H., Han C., Wu T. MiR-17–92 cluster promotes hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2015;36(10):1213–22. DOI: 10.1093/carcin/bgv112. PMID: 26233958.
 28. Chen M., Hu W., Xiong C.L. et al. miR-22 targets *YWHAZ* to inhibit metastasis of hepatocellular carcinoma and its down-regulation predicts a poor survival. *Oncotarget* 2016;7(49):80751–64. DOI: 10.18632/oncotarget.13037. PMID: 27811373.
 29. Ji J., Zheng X., Forgues M. et al. Identification of microRNAs specific for epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;62(3):829–40. DOI: 10.1002/hep.27886. PMID: 25953724.
 30. Caruso S., Calderaro J., Letouzé E. et al. Germline and somatic *DICER1* mutations in familial and sporadic liver tumors. *J Hepatol* 2017;66(4):734–42. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.12.010. PMID: 28012864.
 31. Huang X.P., Hou J., Shen X.Y. et al. MicroRNA-486-5p, which is down regulated in hepatocellular carcinoma, suppresses tumor growth by targeting *PIK3R1*. *FEBS J* 2015;282(3):579–94. DOI: 10.1111/febs.13167. PMID: 25475121.
 32. Li D., Liu X., Lin L. et al. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2011;286(42):36677–85. DOI: 10.1074/jbc.M111.270561. PMID: 21878637.
 33. Zucman-Rossi J., Nault J.C., Llovet J.M. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149(5):1226–39.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.061. PMID: 26099527.
 34. Huang Q., Lin B., Liu H. et al. RNA-Seq analyses generate comprehensive transcriptomic landscape and reveal complex transcript patterns in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011;6(10):e26168. DOI: 10.1371/journal.pone.0026168. PMID: 22043308.
 35. Marquardt J.U., Seo D., Andersen J.B. et al. Sequential transcriptome analysis of human liver cancer indicates late stage acquisition of malignant traits. *J Hepatol* 2014;60(2):346–53. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.10.014. PMID: 24512821.
 36. Ho D.W., Kai A.K., Ng I.O. TCGA whole-transcriptome sequencing data reveals significantly dysregulated genes and signaling pathways in hepatocellular. *Front Med* 2015;9(3):322–30. DOI: 10.1007/s11684-015-0408-9. PMID: 26276037.
 37. Lee T.I., Young R.A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell* 2013;152(6):1237–51. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.014. PMID: 23498934.
 38. Gonda T.J., Ramsay R.G. Directly targeting transcriptional dysregulation in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(11):686–94. DOI: 10.1038/nrc4018. PMID: 26493648.
 39. Wouters J., Kalender Atak Z., Aerts S. Decoding transcriptional states in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2017;(43):82–92. DOI: 10.1016/j.gde.2017.01.003. PMID: 28129557.
 40. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(43):15545–50. DOI: 10.1073/pnas.0506580102. PMID: 16199517.
 41. Creixell P., Reimand J., Haider S. et al. Pathway and network analysis of cancer genomes. *Nat Methods* 2015;12(7):615–21. DOI: 10.1038/nmeth.3440. PMID: 26125594.
 42. Barillot E., Calzone L., Hupe P. et al. Computational systems biology of cancer. U. S.: CRC Press, 2013.
 43. Saito R., Smoot M.E., Ono K. et al. A travel guide to Cytoscape plugins. *Nat Methods* 2012;9(11):1069–76. DOI: 10.1038/nmeth.2212. PMID: 23132118.
 44. http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/Gene_set_enrichment_analysis.html.
 45. Yuryev A. Gene expression profiling for targeted cancer treatment. *Expert Opin Drug Discov* 2015;10(1):91–9. DOI: 10.1517/17460441.2015.971007. PMID: 25306865.
 46. Pan Q., Long X., Song L. Transcriptome sequencing identified hub genes for hepatocellular carcinoma by weighted-gene co-expression analysis. *Oncotarget* 2016;7(25):38487–99. DOI: 10.18632/oncotarget.9555. PMID: 27220887.
 47. Pyatnitskiy M., Mazo I., Shkrob M. et al. Clustering gene expression regulators: new

- approach to disease subtyping. PLoS One 2014;9(1):e84955.
DOI: 10.1371/journal.pone.0084955.
PMID: 24416320.
48. Castillos L., Yuryev A. Developing pathway collection for personalized anti-cancer therapy. Int J Cancer Clin Res 2016;3:043.
DOI: 10.23937/2378-3419/3/1/1043.
49. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2008;359(4):378–90.
DOI: 10.1056/NEJMoa0708857.
PMID: 18650514.
50. Llovet J.M., Villanueva A., Lachenmayer A. et al. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. Nat Rev Clin Oncol 2015;12:408–44.
DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.103.
PMID: 26054909.
51. Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Нарушение функций внутриклеточных сигнальных путей и их возможное влияние на чувствительность гепатоцеллюлярных карцином к сорафенибу. Клиническая лабораторная диагностика 2013;(10):34–7, 66–8. [Makarova A.S., Lazarevich N.L. Deregulation of signaling pathways involved in sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Ddiagnostics 2013;(10):34–7, 66–8. (In Russ.)].
52. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm555548.htm>.
53. <http://www.selleckchem.com/products/Sorafenib-Tosylate.html>.
54. <http://www.selleckchem.com/products/BAY-73-4506.html>.
55. Kudo M. A new era of systemic therapy for hepatocellular carcinoma with regorafenib and lenvatinib. Liver Cancer 2017;6(3):177–84.
DOI: 10.1159/000462153.
PMID: 28626729.
56. Kudo M. Immune checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma: basics and ongoing clinical trials. Oncology 2017;92(Suppl 1):50–62.
DOI: 10.1159/000451016.
PMID: 28147363.
57. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm577166.htm>.

Циклофилин А: строение и функции

А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анастасия Андреевна Калинина aakalinina89@gmail.com

Циклофилины — большое семейство консервативных, филогенетически очень древних белков, обладающих пептидил-пролил-цис-транс-изомеразной активностью. Наиболее распространенным среди них является циклофилин А, который был обнаружен как внутриклеточный лиганд для связывания с циклоспорином А. Изучение механизма супрессии циклоспорином А, в основе которой лежит его взаимодействие с циклофилином А, послужило мощным толчком для исследований последнего. Было установлено, что циклофилин А принимает участие в проведении сигналов в Т-лимфоцитах, участвует в фолдинге, сборке и внутриклеточном транспорте белков, а также играет роль антиоксиданта. При инфекциях и оксидативном стрессе различные типы клеток способны секретировать циклофилин А. Он является одним из центральных факторов, участвующих в воспалении и патогенезе аутоиммунных, сердечно-сосудистых и других заболеваний. Предполагается, что циклофилин А может принимать участие в прогрессии опухолей. Настоящий обзор посвящен описанию строения и известных функций циклофилина А в норме и при различных патологических процессах.

Ключевые слова: циклофилин А, пептидил-пролил-изомераза, CD147, хемоаттрактант, циклоспорин А, воспаление

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-17-23

Cyclophilin A: structure and functions

A.A. Kalinina, L.M. Khromykh, D.B. Kazansky

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Cyclophilins belong to a large family of ancient conservative proteins with peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity. The main member of this family — cyclophilin A — was discovered as an intracellular ligand for cyclosporine A. Further investigations revealed a wide range of functions of cyclophilin A. Cyclophilin A is involved in T-cell signaling, it takes part in folding, assembly and intracellular transport of proteins, as well as acts as an antioxidant. Different cell types secrete cyclophilin A under infection or oxidative stress. Cyclophilin A is one of the main factors involved in inflammation and pathogenesis of autoimmune, cardiovascular and other diseases. This protein is thought to take part in tumor progression. In this review we describe the structure of cyclophilin A and its main known functions in health and disease.

Key words: cyclophilin A, peptidyl-prolyl isomerase, CD147, chemoattractant, cyclosporine A, inflammation

Введение

В 1984 г. из клеток тимуса быка был выделен белок с молекулярной массой 18 кДа, который назвали циклофилином [1]. В этом же году G. Fischer и соавт. выделили из коркового вещества почки свиньи белок с молекулярной массой 18 кДа, который обладал пептидил-пролил-цис-транс-изомеразной активностью [2]. В начале 1989 г. независимые группы G. Fischer и N. Takahashi установили, что пептидил-пролил-изомераза и циклофилин — один и тот же белок [3, 4].

В клинической практике широко используется циклоспорин А, который является одним из наиболее важных звеньев иммуносупрессивной терапии, применяемой при трансплантации органов. При изучении механизма действия циклоспорином А была выявлена его способность селективно ингибировать Т-хелперную субпопуляцию лимфоцитов, однако оставалось непонятно, каким образом достигался этот супрессорный эффект.

Исследования показали, что циклофилин А — внутриклеточный лиганд циклоспорином А [5], иммуносупрессорное действие которого реализуется за счет связывания комплекса циклоспорин А — циклофилин А с кальцийнейрином (кальций-кальмодулин-зависимая серин/треонин протеинфосфатаза) (рис. 1). В результате отмены действия кальцийнейрина блокируется переход ядерного фактора активированных Т-лимфоцитов из цитоплазмы в ядро, что препятствует транскрипции генов, кодирующих различные цитокины, в частности интерлейкин 2 [6], дефицит которого подавляет развитие Т-клеточного иммунного ответа.

Циклофилин А — наиболее распространенный белок семейства циклофилинов, которые являются эволюционно древними высококонсервативными белками и обнаруживаются у млекопитающих, насекомых, растений, грибов и бактерий. Все циклофилины обладают пептидил-пролил-цис-транс-изомеразной активностью (рис. 2), которая играет важную роль в фолдинге и сборке мультидоменных белков [6], внутриклеточном

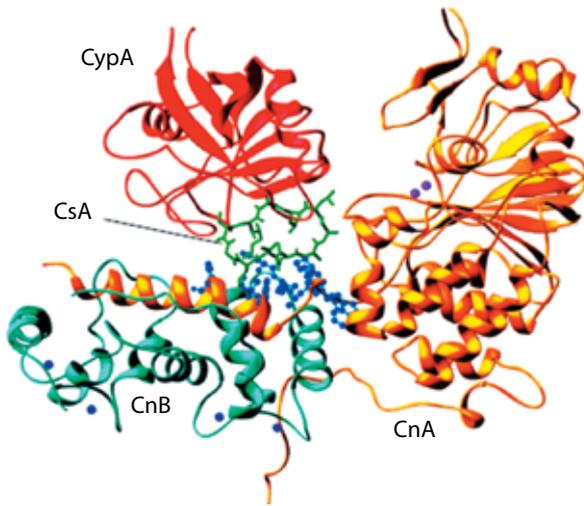


Рис. 1. Структура комплекса циклоспорин А (CsA) – циклофилин А (CypA) – кальцийнейрин (Cn) [6]. Комплекс циклоспорин А – циклофилин А лежит на спирали каталитической субъединицы кальцийнейрина (CnA), которая связана со своей регуляторной субъединицей (CnB). Обе субъединицы формируют гидрофобный желоб, уникальный для кальцийнейрина, с которым комплекс циклоспорин А – циклофилин А связывается с высокой специфичностью (адаптировано из [6])

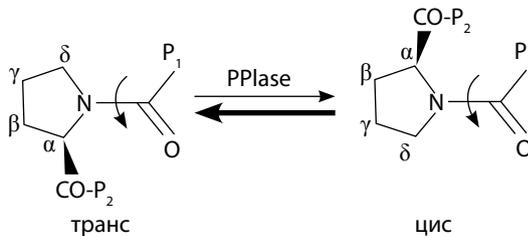


Рис. 2. Пептидил-пролил-изомеразная активность циклофилинов. Схематичное изображение транс- и цис-изомеров амидной связи между пролином и другой аминокислотой (P_1) белка при катализе циклофилином (PPIase) процесса изомеризации. Атомы углерода пролина указаны греческими буквами; P_2 – третья аминокислота с другой стороны пролина (адаптировано из [6])

транспорте белков, поддержании стабильности мультибелковых комплексов, регуляции транскрипции и клеточного цикла, а также в передаче сигнала от Т-клеточного рецептора и клеточной дифференцировке [7].

Строение циклофилина А

Циклофилин А состоит из 165 аминокислот. Структурно данный белок образован восемью антипараллельными β -слоями и двумя α -спиралями (рис. 3). Неглубокий карман, образованный аминокислотными остатками R55, F60, M61, Q63, F113, W121, L122 и H126, составляет активный сайт пептидил-пролил-изомеразы. При этом остаток R55 является главным каталитическим центром, так как точечная мутация R55A приводит к полной потере изомеразной активности циклофилина А [8, 9].

Зона связывания циклофилина А с циклоспорином А представляет собой компактный гидрофобный кор, сформированный петлей от Lys118 до His126 и четырьмя β -слоями (β_3 – β_6). Эта зона совпадает с каталити-

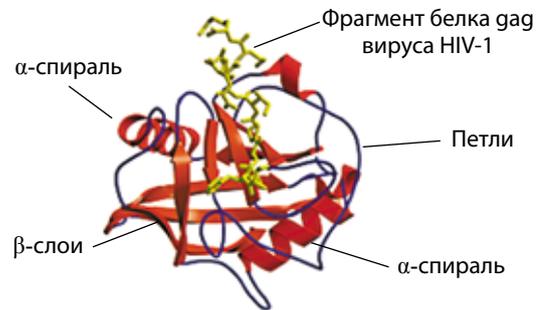


Рис. 3. Кристаллическая структура циклофилина А: α -спирали показаны красным цветом, β -слои – оранжевым, петли – синим. Желтым цветом показан фрагмент белка gag вируса HIV-1, с которым способен соединяться циклофилин А (адаптировано из [10])

ческим центром циклофилина А, поскольку циклоспорин А связывается с данным белком через остатки R55, F60, M61, Q63, G72, A101, N102, A103, Q111, F113, W121, L122 и H126 (рис. 4) [8].

Внутриклеточный циклофилин А: локализация и функции

Цитозольный циклофилин А присутствует во всех тканях млекопитающих (табл. 1). В паренхиматозных органах данный белок содержится в основном в клетках паренхимы, а не стромы. Исключением являются почки, где циклофилин А продуцируется главным образом в эпителиальных клетках проксимальных канальцев [11]. Большое количество циклофилина А обнаруживается в эритроцитах селезенки и миелобластах [5]. Самый высокий уровень данного белка отмечается в головном мозге, в частности в коре головного мозга и гиппокампе, при этом в нейронах, особенно в клетках Пуркинью, его содержится больше, чем в клетках глии [5, 11].

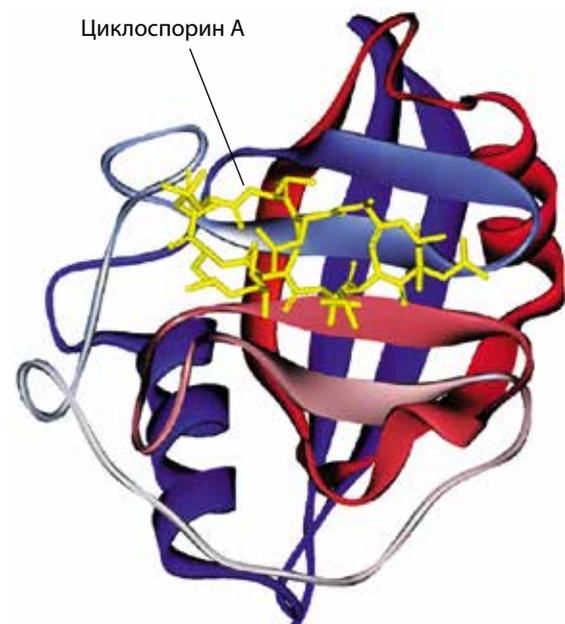


Рис. 4. Структура комплекса циклофилин А – циклоспорин А [Protein Data Bank]

Таблица 1. Содержание циклофилина А в различных тканях человека, мкг/мг общего белка [7]

Орган/ткань	Среднее значение ± стандартное отклонение, полученное при анализе 4 экстрактов одного органа
Кора головного мозга	2,8 ± 0,4
Жировая ткань	1,1 ± 0,2
Сердце	1,1 ± 0,2
Кишечник	1,3 ± 0,3
Почки	1,3 ± 0,4
Печень	0,9 ± 0,2
Легкие	0,8 ± 0,1
Лимфатические узлы	1,4 ± 0,4
Поджелудочная железа	1,5 ± 0,2
Околоушная железа	1,7 ± 0,3
Кожа	0,8 ± 0,1
Селезенка	1,5 ± 0,3
Тимус	1,6 ± 0,4

Помимо общих для всех членов семейства функций, внутриклеточный циклофилин А обладает антиоксидантными свойствами. Он защищает кардиомиоциты от гибели при реперфузии, вследствие которой происходит накопление супероксидного радикала и перекиси водорода [12, 13]. Данный процесс осуществляется за счет связывания циклофилина А с тиолспецифичным антиоксидантом Aop1, что приводит к усилению ферментативной активности последнего [12, 14]. Являясь шапероном, данный белок участвует в ослаблении токсического эффекта белковых агрегатов, которые могут обуславливать гибель нейронов после оксидативного стресса, в том числе после ишемии [15].

Циклофилин А также регулирует проведение внутриклеточного сигнала в Т-клетках, в норме ингибируя действие нерцепторной тирозинкиназы Itk, необходимой для активации Т-хелперов 2-го типа, путем взаимодействия с ее регуляторным пролиновым остатком. Это было показано на нокаутных по циклофилину А мышях, которые оказались предрасположены к спонтанному развитию аллергии [16].

Секреторный циклофилин А: хемоаттрактант и провоспалительный фактор

В 1992 г. впервые было показано, что при стимуляции липополисахаридом макрофаги мыши способны секретировать циклофилин А [17]. В ходе дальнейших исследований установлено, что данный белок может секретироваться клетками различных тканей в ответ на инфекцию и при оксидативном стрессе, в том числе в условиях гипоксии [13, 17, 18]. Секретция происходит

неклассическими путями, в том числе через везикулы, поскольку циклофилин А, в отличие от других членов своего семейства, не содержит сигнальной последовательности для транспорта в аппарат Гольджи [9, 19].

Одна из самых важных функций секреторного циклофилина А заключается в его роли хемоаттрактанта и провоспалительного фактора. Циклофилин А стимулирует миграцию стволовых клеток, а также предшественников дендритных клеток, гранулоцитов, Т- и В-клеток из костного мозга на периферию [20]. Он способствует дифференцировке и созреванию дендритных клеток за счет повышения экспрессии поверхностных маркеров CD11b и CD11c. Циклофилин А также усиливает захват и презентацию антигенов незрелыми дендритными клетками, участвуя таким образом в развитии адаптивного иммунного ответа [21].

Исследования *in vitro* показали, что данный белок вызывает хемотаксис нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека [19]. Он также является хемоаттрактантом для эозинофилов и стимулирует их дегрануляцию (выброс пероксидазы) [22]. Кроме того, циклофилин А индуцирует хемотаксис активированных Т-клеток, особенно Т-хелперов 2-го типа [23, 24]. Таким образом формируется очаг воспаления, в котором происходит локальное повышение уровня секреторного циклофилина А. Это, в свою очередь, усугубляет воспалительный процесс за счет усиления инфильтрации тканей клетками иммунной системы [16, 25].

Хемокиновая функция циклофилина А реализуется посредством взаимодействия с его основным рецептором CD147, известным также как внеклеточный индуктор матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN). Данный рецептор является трансмембранным гликопротеином 1-го типа с молекулярной массой 45–65 кДа (рис. 5).

CD147 экспрессируется практически на всех типах клеток, в том числе на гемопоэтических, эпителиальных

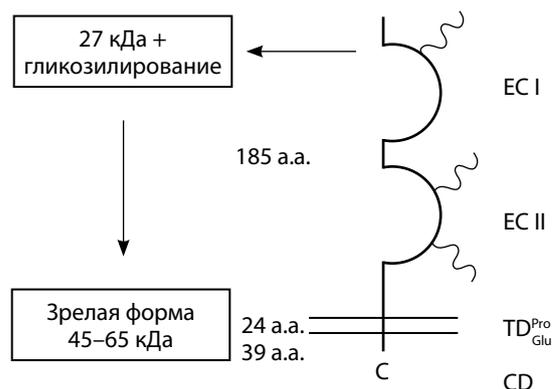


Рис. 5. Схематичное строение молекулы CD147. EC I – 1-й иммуноглобулиновый домен; EC II – 2-й иммуноглобулиновый домен; TD – трансмембранный домен; CD – цитоплазматический домен; в виде спиралей показаны 3 олигосахарида, связанных с N-терминальным концом молекулы; а.а. – аминокислотные остатки, Pro – пролин, Glu – глутамин (адаптировано из [26])

и эндотелиальных клетках, фибробластах, тромбоцитах, лейкоцитах [27] и эритроцитах [28], и имеет важное значение для их нормального функционирования. Например, экспрессирующийся на поверхности зрелых, циркулирующих в крови эритроцитов рецептор CD147 играет роль молекулы адгезии и необходим для выхода зрелых эритроцитов из селезенки в кровоток [28].

Стоит особо отметить, что при воспалительном процессе секреторный циклофилин А по аутокринно-паракринному механизму стимулирует экспрессию рецептора CD147 на поверхности иммунных клеток и поддерживает активированное состояние привлеченных в очаг воспаления клеток, что усугубляет течение заболеваний. Например, при ревматоидном артрите наблюдается локальное и системное повышение уровня секреторного циклофилина А [24], который индуцирует миграцию гранулоцитов, моноцитов/макрофагов [29, 30] и нейтрофилов [31] в синовиальную жидкость, где происходит усиление экспрессии CD147 на поверхности этих клеток.

Помимо развития воспалительных и аутоиммунных процессов, циклофилин А также участвует в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний. Так, у мышей-нокаут по циклофилину А не происходит структурной перестройки стенок сосудов, не наблюдается повреждение тканей при ишемии/реперфузии, не развиваются аневризма аорты, атеросклероз и гипертрофия сердца [31]. В то же время при ишемии/реперфузии секретируемый кардиомиоцитами циклофилин А может выступать как бифазный медиатор и оказывать кардиопротективное действие за счет активации антиапоптотического сигнального каскада [13, 32].

Роль циклофилина А в канцерогенезе

Особый интерес представляет роль циклофилина А в развитии онкологических заболеваний. Имеющиеся на сегодняшний день данные демонстрируют, что содержание внутриклеточного циклофилина А повышается в клетках опухолей различного гистогенеза, в том числе в клетках рака легкого (особенно немелкоклеточного), печени, аденокарциномы поджелудочной железы, карциномы эндометрия, плоскоклеточного рака пищевода и меланомы [18]. На уровне матричной РНК было показано достоверное увеличение экспрессии циклофилина А при злокачественной трансформации практически всех изученных тканей (табл. 2).

Повышение экспрессии циклофилина А считается плохим прогностическим фактором при некоторых типах рака, поскольку данный белок может участвовать в прогрессии опухоли. К возможным проонкогенным функциям циклофилина А относят стимуляцию пролиферации, миграции и метастазирования злокачественных клеток, участие в ангиогенезе солидных опухолей, а также в формировании лекарственной устойчивости раковых клеток.

Таблица 2. Экспрессия матричной РНК циклофилина А в различных органах и тканях в норме и при опухолевой трансформации [18]

Орган/ткань	Количество транскриптов циклофилина А на 200 000 транскриптов (M ± SED)	
	Нормальная ткань	Опухолевая ткань
Головной мозг	181 ± 28	270 ± 14
Молочная железа	229 ± 16	319 ± 22
Толстый кишечник	87 ± 23	234 ± 2
Почки	195 ± 98	540
Печень	156	943
Лимфатические узлы	316 ± 156	612 ± 51
Мышцы	23 ± 5	332
Поджелудочная железа	92	140 ± 4
Брюшина	134	258
Сетчатка глаза	188 ± 34	452
Кожа	236 ± 26	423 ± 121
Желудок	181 ± 61	353 ± 25
Щитовидная железа	351	401
Предстательная железа	352 ± 110	410 ± 69

Результаты экспериментов *in vitro* с использованием клеточных линий мелкоклеточного рака легких [33] и аденокарциномы поджелудочной железы человека [34] показали, что циклофилин А способен стимулировать пролиферацию злокачественных клеток. Это происходит за счет индукции экспрессии циклинов D1, Cdk4 и, таким образом, перехода клеточного цикла из фазы G1 в фазу S [35]. Подавление экспрессии внутриклеточного циклофилина А малыми интерферирующими РНК приводило к аресту клеток карциномы эндометрия в фазе G0/G1 [36]. Результаты исследований *in vitro* на линии клеток рака поджелудочной железы Pan-1 продемонстрировали, что митогенная активность циклофилина А опосредована взаимодействием с рецептором CD147, которое приводит к активации сигнальных путей ERK1/2 и p38, а также к продукции опухолевыми клетками интерлейкинов 5 и 17, проявляющих проонкогенное действие [34]. Стоит отметить, что в стимуляции пролиферации важную роль играет пептидил-пролил-изомеразная активность циклофилина А [33].

В экспериментах *in vitro* на клеточной линии остеосаркомы U2OS было показано, что подавление экспрессии циклофилина А посредством интерферирующих РНК или блокирование его изомеразной активности циклоспорином А приводило к снижению миграции этих клеток. Аналогичным образом циклоспорин А подавлял *in vitro* миграцию и инвазию высокометастатической

линии рака молочной железы ER-MDA-231. Кроме того, *in vivo* обработка циклоспорином А приводила к значительному некрозу первичного опухолевого узла и полному отсутствию метастазов у мышей с ксенографтами рака молочной железы [18].

Вероятно, в стимуляции миграции и метастазирования злокачественных клеток важную роль может играть взаимодействие циклофилина А с CD147. Было показано, что этот рецептор экспрессируется в первичных опухолях (рак предстательной железы, печени, желудка [37], мочевого пузыря, кожи, легкого, молочной железы [38]) и клетках микрометастазов. Его роль в прогрессии и ранних этапах метастазирования опухоли подтвердили эксперименты *in vivo* на мышах *nude*, у которых при трансфекции клеток рака молочной железы комплементарной ДНК CD147 наблюдалось значительное усиление роста данной опухоли [38]. Результаты иммуногистохимических исследований показали, что CD147 экспрессируется преимущественно на периферии кластеров прорастающих злокачественных клеток, что может свидетельствовать об участии этого рецептора в инвазии опухоли. Это было подтверждено экспериментами *in vitro* на клетках меланомы и плоскоклеточной карциномы: связывание CD147 блокирующими антителами приводило к существенному подавлению инвазии данных опухолевых клеток через искусственную базальную мембрану [38].

Контакт опухолевых клеток со стромой через CD147, а также непосредственное взаимодействие циклофилина А с этим рецептором могут приводить к экспрессии стромальными и раковыми клетками матриксных металлопротеиназ, которые представляют собой секретируемые или связанные с мембраной Zn²⁺-зависимые эндопептидазы [39, 40]. Металлопротеиназы участвуют в нескольких стадиях развития опухоли, в том числе в инвазии и метастазировании опухоли посредством разрушения компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны, что способствует проникновению опухолевых клеток в кровеносные сосуды [40]. Кроме того, металлопротеиназы регулируют ангиогенез опухоли за счет продукции активных проангиогенных факторов во внеклеточном матриксе [41]. Сам циклофилин А также способен стимулировать ангиогенез солидной опухоли [18], так как наблюдающаяся при ее росте и развитии гипоксия индуцирует продукцию данного белка опухолевыми, эндотелиальными клетками и клетками гладкой мускулатуры сосудов [42], в результате чего происходит их активация и пролиферация [18].

Повышенная продукция циклофилина А в опухолевых клетках стимулирует экспрессию генов, ассоциированных с транспортом и метаболизмом лекарственных средств [43]. Так, циклофилин А стимулирует экспрессию генов, кодирующих интерлейкин 6, белки множественной лекарственной устойчивости (2 и 3) и глутатионтрансферазу зета 1, которые участвуют в формировании лекарственной устойчивости [31].

Циклофилин А также стимулирует экспрессию аденозинтрифосфатсвязанных кассетных транспортеров (ABC-транспортеров), которые уменьшают накопление лекарственного средства внутри клетки [43]. Результаты экспериментов на линии клеток печени SK-Nep-1-CyPA, стабильно экспрессирующих циклофилин А, показали, что данные клетки обладают повышенной устойчивостью к противоопухолевым препаратам доксорубину и винкристину [31]. Интересно отметить, что различные химиотерапевтические агенты влияют на уровень продукции циклофилина А. Так, 5-аза-2-деоксицитидин, целекоксиб и 5-фторурацил снижают экспрессию данного белка в опухолевых клетках. Кроме того, циклоспорин А и санглиферин А, способные связываться с циклофилином А, повышают химиотерапевтический эффект цисплатина при мультиформной глиобластоме [31].

Заключение

Циклофилин А является белком с многочисленными функциями, важными как для поддержания нормальной жизнедеятельности организма, так и для развития различных заболеваний, включая онкологические.

Цитозольный циклофилин А участвует в фолдинге, транспорте и сборке белков, а также обладает антиоксидантными свойствами. Внутриклеточный циклофилин А участвует в передаче сигнала от T-клеточного рецептора и является лигандом для циклоспорина А, что и обуславливает иммуносупрессивное действие последнего.

При иммунном ответе организма на инфекции различные типы клеток секретируют циклофилин А, который является хемокином, привлекающим клетки иммунной системы в очаг воспаления. Как провоспалительный фактор циклофилин А также участвует в развитии аутоиммунных и аллергических заболеваний, таких как ревматоидный артрит и астма.

Секретируемый при оксидативном стрессе циклофилин А является бифазным медиатором, который, с одной стороны, обладает нейро- и кардиопротективным действием, а с другой — участвует в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний.

Разнонаправленное действие циклофилина А отмечается и при онкологических заболеваниях. С одной стороны, повышение экспрессии данного белка в различных типах злокачественных клеток может стимулировать их пролиферацию, миграцию, инвазию, а также способствовать ангиогенезу опухолевой ткани и формированию лекарственной устойчивости раковых клеток. С другой стороны, отмечена отрицательная корреляция продукции циклофилина А с инвазивностью и метастазированием клеток различных форм аденокарциномы желудка [40].

Возможно, что наблюдаемое при некоторых онкологических заболеваниях локальное увеличение экспрессии циклофилина А является следствием

воспалительных процессов, сопровождающих формирование опухоли, или представляет собой защитную реакцию иммунной системы, нацеленную на борьбу со злокачественными новообразованиями. Способствуя дифференцировке и созреванию дендритных клеток, циклофилин А может участвовать в развитии адаптивного иммунного ответа с преобладанием медиаторов Т-хелперов 1-го типа, что является хорошим прогностическим фактором для большинства заболеваний. Кроме того, проявляя свойства хемоаттрактанта для стволовых клеток и предшественников различных ростков дифференцировки, циклофилин А может стимулировать восстановление кроветворной и иммунной систем организма при цитопениях, возникающих вследствие различных стрессов, включая химио- и радиотерапию.

В условиях гипоксии, наблюдающейся при росте солидных опухолей, циклофилин А секретируется

клетками эндотелия и гладкой мускулатуры сосудов и по аутокринно-паракринному механизму стимулирует их активацию и пролиферацию, являясь проангиогенным фактором. С другой стороны, секретируемый циклофилин А может привлекать активированные клетки иммунной системы, инфильтрирующие опухоль, и сдвигать баланс цитокинов в сторону Т-хелперов 1-го типа (интерферон гамма, фактор некроза опухоли и др.), запускающих иммунный ответ по киллерному, а не супрессорному пути.

Потенциальная противоопухолевая активность секреторного циклофилина А на сегодняшний день практически не исследована, и дальнейшее изучение механизмов действия данного белка, его рецепторов и функций имеет не только важное фундаментальное значение, но может привести к появлению новых подходов в терапии как онкологических, так и других заболеваний.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Handschoemacher R. E., Harding M. W., Rice J. et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984;226(4674):544–6.
- Fischer G., Bang H., Mech C. Detection of enzyme catalysis for cis-trans isomerization of peptide bonds using proline containing peptides as substrates. *Biomed Biochim Acta* 1984;43:1101–12.
- Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K. et al. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 1989;337(6206):476–8.
- Takahashi N., Hayano T., Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 1989;337(6206):473–5.
- Wang P., Heitman J. Cyclophilins. *Genome Biology* 2005;6(7):226.
- Honga F., Leeb J., Piao Y.J. et al. Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(4):1073–80.
- Song F., Zhang X., Ren X.B. et al. Cyclophilin A (CyPA) induces chemotaxis independent of its peptidylprolyl cis-trans isomerase activity: direct binding between CyPA and the ectodomain of CD147. *J Biol Chem* 2011;286(10):8197–203.
- Bahmed K., Henry C., Holliday M. et al. Extracellular cyclophilin A stimulates ERK1/2 phosphorylation in a cell-dependent manner but broadly stimulates nuclear factor kappa B. *Cancer Cell Int* 2012;12(1):19.
- Zhao Y., Chen Y., Schutkowski M. et al. Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity. *Structure* 1997;5(1):139–46.
- Ryffel B., Woerly G., Greiner B. et al. Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 1991;72(3):399–404.
- Doyle V., Virji S., Crompton M. Evidence that cyclophilin A protects cells against oxidative stress. *Biochem J* 1999;341(Pt 1):127–32.
- Seko Y., Fujimura T., Taka H. et al. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317(1):162–8.
- Jäschke A., Mi H., Tropschug M. Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity. *J Mol Biol* 1998;277(4):763–9.
- Hu B.R., Martone M.E., Jones Y.Z., Liu C.L. Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 2000;20(9):3191–9.
- Colgan J., Asmal M., Neagu M. et al. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in I κ B. *Immunity* 2004;21(2):189–201.
- Sherry B., Yarlett N., Strupp A., Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(8):3511–5.
- Obchoei S., Wongkhan S., Wongkham C. et al. Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. *Med Sci Monit* 2009;15(11):221–32.
- Suzuki J., Jin Z.G., Meoli D.F. et al. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2006;98(6):811–7.
- Khromykh L.M., Kulikova N.L., Anfalova T.V. et al. Cyclophilin A produced by thymocytes regulates the migration of murine bone marrow cells. *Cell Immunol* 2007;249(1):46–53.
- Bharadwaj U., Zhang R., Yang H. et al. Effects of cyclophilin A on myeloblastic cell line KG-1 derived dendritic like cells (DLC) through p38 MAP kinase activation. *J Surg Res* 2005;127(1):29–38.
- Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A. et al. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem* 1992;267(17):11968–71.
- Damsker J.M., Bukrinsky M.I., Constan S.L. Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by

- extracellular cyclophilin A. *J Leukoc Biol* 2007;82(3):613–8.
23. Gwinn W.M., Damsker J.M., Falahati R. et al. Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J Immunol* 2006;177(7):4870–9.
 24. Arora K., Gwinn W.M., Bower M.A. et al. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol* 2005;175(1):517–22.
 25. Nabeshima K., Iwasaki H., Koga K. et al. EMMPRIN (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int* 2006;56(7):359–67.
 26. Yurchenko V., Constant S., Bukrinsky M. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology* 2006;117(3):301–9.
 27. Coste I., Gauchat J.F., Wilson A. et al. Unavailability of CD147 leads to selective erythrocyte trapping in the spleen. *Blood* 2001;97(12):3984–8.
 28. Konttinen Y.T., Li T.F., Mandelin J. et al. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):275–80.
 29. Damsker J.M., Okwumabua I., Bukrinsky M.I., Constant S.L. Contribution of cyclophilin-CD147 interactions in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006;176:47.
 30. Nigro P., Pompilio G., Capogrossi M.C. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* 2013;4:e888.
 31. Iacono K.T., Brown A.L., Greene M.I., Saouaf S.J. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* 2007;83(3):283–95.
 32. Yang H., Chen J., Yang J. et al. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361(3):763–7.
 33. Li M., Zhai Q., Bharadwaj U. et al. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. *Cancer* 2006;106(10):2284–94.
 34. Semba S., Huebner K. Protein expression profiling identifies cyclophilin A as a molecular target in Fhit-mediated tumor suppression. *Mol Cancer Res* 2006;4(8):529–38.
 35. Li Z., Zhao X., Bai S. et al. Proteomics identification of cyclophilin A as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 2008;7(10):1810–23.
 36. Schlegel A.J., Redzic J.S., Porter C.C. et al. Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A. *J Mol Biol* 2009;391(3):518–35.
 37. Gabison E.E., Hoang-Xuan T., Mauviel A., Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* 2005;87(3–4):361–8.
 38. Davies B., Miles D.W., Happerfield L.C. et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1993;67(5):1126–31.
 39. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):161–74.
 40. Tang Y., Nakada M.T., Kesavan P. et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2005;65(8):3193–9.
 41. Choi K.J., Piao Y.J., Lim M.J. et al. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res* 2007;67(8):3654–62.
 42. Chen S., Zhang M., Ma H. et al. Oligo-microarray analysis reveals the role of cyclophilin A in drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61(3):459–69.
 43. Grigoryeva E.S., Cherdyntseva N.V., Karbyshev M.S. et al. Expression of cyclophilin A in gastric adenocarcinoma patients and its inverse association with local relapses and distant metastasis. *Pathol Oncol Res* 2014;20(2):467–73.

Анализ относительной экспрессии гена *HMGA2* и онкогенной микроРНК-221 в цитологических препаратах, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы

С.Е. Титов^{1,2}, М.К. Иванов^{1,2}, Е.В. Цивликова², М.С. Ганжа², Е.С. Малахина¹, А.В. Малек^{3,4}, Т.Л. Полоз⁵, С.П. Шевченко⁶, **Н.Н. Колесников¹**

¹ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН;
Россия, 630090 Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева, 8/2;

²АО «Вектор-Бест»; Россия, 630559 Новосибирская область, пос. Колъцово, Научно-производственная зона, корпус 36;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;
Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

⁴ООО «Онко-система»; Россия, 194356 Санкт-Петербург, ул. Хошимина, 11;

⁵НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД»; Россия, 630003 Новосибирск,
Владимировский спуск, 2а;

⁶ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 1»; Россия, 630047 Новосибирск, ул. Залесского, 6

Контакты: Сергей Евгеньевич Титов titovse78@gmail.com

Введение. Цитологический анализ препаратов тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии является «золотым стандартом» дооперационной диагностики рака щитовидной железы (ЩЖ). Однако этот метод не всегда позволяет надежно дифференцировать доброкачественные и злокачественные узлы ЩЖ. Так, цитологическое заключение «фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль» предполагает оперативное вмешательство. Однако в большинстве случаев это заключение соответствует не фолликулярному раку, а доброкачественной фолликулярной аденоме, в отношении которой хирургическое вмешательство оказывается избыточным. В связи с этим актуален поиск биологических маркеров, анализ содержания которых мог бы повысить специфичность определения злокачественных опухолей. К таким маркерам может относиться повышение уровня экспрессии онкогенов или изменение экспрессии микроРНК, поскольку известно, что при развитии опухолей ЩЖ существенно меняется содержание целого ряда микроРНК.

Материалы и методы. С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с детекцией в реальном времени проведен анализ уровня экспрессии гена *HMGA2*, в норме активного на эмбриональной стадии, и онкогенной микроРНК *miRNC-221* в 713 цитологических препаратах ЩЖ (окрашенный материал, высушенный на стеклах), полученных при выполнении стандартной тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии. Выборка включала препараты, соответствующие разным цитологическим заключениям: доброкачественные образования ($n = 375$), фолликулярные опухоли или подозрение на фолликулярную опухоль ($n = 143$), медулярный рак ($n = 7$), папиллярный рак ($n = 186$), анапластический рак ($n = 2$).

Результаты. Содержание матричной РНК (мРНК) *HMGA2* ($P = 1,6 \times 10^{-66}$; площадь под ROC-кривой 0,927) оказалось достоверно повышенным при папиллярном раке по сравнению с доброкачественными опухолями. Фолликулярные опухоли продемонстрировали существенную неоднородность по содержанию обоих молекулярных маркеров. При этом для образцов из этой группы с повышенным (в среднем в 85 раз) уровнем экспрессии гена *HMGA2* был характерен также повышенный (в среднем в 3 раза) уровень *miRNC-221*. Группа фолликулярных опухолей, в которых не выявлены повышенные уровни мРНК гена *HMGA2*, по содержанию перечисленных маркеров не отличалась от группы доброкачественных образований.

Заключение. Полученные результаты показывают, что оценка экспрессии мРНК *HMGA2* и онкогенной *miRNC-221* позволяет дифференцировать на дооперационной стадии папиллярный рак ЩЖ и доброкачественные неопухолевые образования, а по содержанию мРНК *HMGA2* можно разделить группу фолликулярных опухолей на подгруппы, предположительно различающиеся по риску злокачественности.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, молекулярные маркеры, *HMGA2*, микроРНК-221, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-24-31

Analysis of relative expression of the *HMGA2* gene and oncogenic microRNA-221 in cytological slides obtained by a fine-needle aspiration biopsy of the thyroid nodules

S.E. Titov^{1,2}, M.K. Ivanov^{1,2}, E.V. Tsivlikova², M.S. Ganzha², E.S. Malakhina¹, A.V. Malek^{3,4}, T.L. Poloz⁵, S.P. Shevchenko⁶, **N.N. Kolesnikov¹**

¹Institute of Molecular and Cell Biology Siberian branch of Russian Academy of Sciences; 8/2 Acad. Lavrent'eva prospect, Novosibirsk 630090, Russia;

²Vector-Best; build. 36 Scientific-production zone, Kol'tsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russia;

³N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

⁴Oncosystem; 11 Khoshimina St., Saint Petersburg 194356, Russia;

⁵Railway Clinical Hospital on the Station Novosibirsk-Glavnyy; 2a Vladimirovskiy Spusk, Novosibirsk 630003, Russia;

⁶City Clinical Hospital No. 1; 6 Zalesskogo St., Novosibirsk 630047, Russia

Background. Fine-needle aspiration biopsy is recognized as the “gold standard” in the preoperative diagnosis of thyroid cancer. However, this method does not always allow reliable differentiation between benign and malignant thyroid nodules. Thus, the cytological report of a “follicular neoplasm or suspicious for a follicular neoplasm” suggests surgical lobectomy. However, in most cases, this conclusion does not point to follicular cancer but to benign neoplasm, follicular adenoma, where the surgical intervention is excessive. This implies the great relevance of finding biological markers capable of enhancing the specificity of detecting malignant neoplasms. Such markers may include an increase in the level of expression of oncogenes or a change in the expression of microRNA, since it is known that the content of a number of microRNAs changes significantly during the development of thyroid tumors.

Materials and methods. The expression level of the *HMGA2* gene, normally active at the embryonic stage, and oncogenic *miR-221* microRNA was analyzed using real-time reverse transcription polymerase chain reaction in 713 cytological preparations of the thyroid gland (stained material dried on glasses) obtained by standard fine-needle aspiration biopsy. The sample included preparations corresponding to different cytological diagnoses: benign ($n = 375$), follicular neoplasm or suspicious for a follicular neoplasm ($n = 143$), medullary carcinoma ($n = 7$), papillary carcinoma ($n = 186$) and anaplastic carcinoma ($n = 2$).

Results. The content of messenger RNA (mRNA) *HMGA2* ($P = 1.6 \times 10^{-66}$, area under curve ROC 0.946) and *miR-221* ($P = 6.3 \times 10^{-61}$, area under curve ROC 0.927) proved to be significantly elevated in papillary carcinoma compared to benign tumors. Follicular neoplasms showed significant heterogeneity in the quantity of both molecular markers. At the same time, an elevated level of *miR-221* (3 times on average) was also characteristic of samples from this group with an increased level of expression of the *HMGA2* gene (an average of 85 times). With regard to the quantity of these markers, the group of follicular neoplasms, in which no increase in the *HMGA2* mRNA level was detected, did not differ from the group of benign nodules.

Conclusions. The obtained results show that assessing the expression of *HMGA2* mRNA and oncogenic *miR-221* makes it possible to differentiate the papillary thyroid carcinoma from goiter at the preoperative stage, and based on the content of the *HMGA2* mRNA, the group of follicular neoplasms can be divided into subgroups presumably differing in the risk of malignancy.

Key words: thyroid cancer, molecular markers, *HMGA2*, microRNA-221, fine needle aspiration biopsy

Введение

Среди всех заболеваний эндокринной системы узловые патологии щитовидной железы (ЩЖ) преобладают по распространенности и встречаются (по различным данным) у 4–10 % населения. Большинство (~95 %) узлов доброкачественные и не требуют оперативного вмешательства [1]. Точность дооперационного определения типа узловой патологии принципиальна, поскольку диагноз определяет необходимость и объем хирургического вмешательства. Основной метод дооперационной диагностики – цитологическое исследование препарата, полученного с помощью направляемой ультразвуком тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии. Несмотря на то, что цитологический анализ на данный момент является «золотым стандартом» дооперационной диагностики, его технические ограничения и зависимость от подготовки исполнителя в ряде случаев не позволяют надежно дифференцировать доброкачественные и злокачественные узлы [2]. Особенно это касается фолликулярных опухолей. Цитологический анализ не в состоянии разделить доброкачественные фолликулярные аденомы (ФА), не требующие хирургического вмешательства, и фолликулярный рак (ФР). В результате пациентов, у которых развивается ФА, по результатам цитологического анализа направляют на операцию, которая является ненужной и может иметь долговременные отрицательные последствия для здоровья. Применение на стадии дооперационной диагностики дополнитель-

ных диагностических тестов с более высокой положительной предсказательной ценностью в отношении злокачественных опухолей могло бы помочь снизить долю нежелательных медицинских манипуляций.

Негистоновые белки хроматина из семейства *HMGA* (high mobility group A), являющиеся архитектурными факторами транскрипции, достаточно давно известны как маркеры злокачественности и быстрой прогрессии [3]. Белки *HMGA* влияют на целый спектр биологических процессов в клетке, включая рост, пролиферацию и дифференцировку. Оба гена, кодирующие белки *HMGA* (*HMGA1* и *HMGA2*), активно экспрессируются на эмбриональном этапе развития, в то время как в клетках взрослого организма их экспрессия находится на фоновом уровне [4]. Однако при развитии злокачественных опухолей эпителиального происхождения уровень экспрессии этих генов опять значительно повышается. Увеличение уровня экспрессии гена *HMGA2* было отмечено при раке толстой кишки [5], мочевого пузыря [6], ЩЖ [7], кожи [8], яичников [9] и др.

Возможность оценки уровня экспрессии гена *HMGA2* для стратификации злокачественных и доброкачественных опухолей и неопухолевых образований в препаратах ЩЖ с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) впервые показана почти 10 лет назад [10]. Авторы проанализировали выборку гистологических препаратов ($n = 61$), представленную преимущественно образцами папиллярного рака (ПР; $n = 28$), ФА ($n = 19$) и ФР ($n = 9$),

и выявили повышение уровня экспрессии этого гена в злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными. Чувствительность и специфичность определения злокачественных новообразований, основанные на оценке содержания матричной РНК (мРНК) *HMGA2*, составили 95,9 и 93,9 % соответственно [10]. Схожая методика использована в работе [11], в которой был проведен анализ экспрессии *HMGA2* в 115 цитологических препаратах с известным гистологическим заключением. Несмотря на высокую (97 %) специфичность определения злокачественных новообразований, диагностическая чувствительность составила лишь 71 %, что может быть связано с иной структурой выборки, в которой лишь небольшую ($n = 22$ (19,1 %)) долю составили образцы ПР, но при этом 80 (69,6 %) образцов представляли собой фолликулярные опухоли. В работе [12] на выборке из 170 гистологических и 226 цитологических препаратов узлов ЩЖ было подтверждено существенное повышение уровня экспрессии гена *HMGA2* в большинстве злокачественных опухолей по сравнению с доброкачественными опухолями и образованиями, а также продемонстрирована высокая корреляция между результатами цитологического и гистологического исследования препаратов. В то же время в некоторых работах авторам не удалось выявить достоверных различий в уровне экспрессии гена *HMGA2* в злокачественных и доброкачественных опухолях и образованиях с помощью количественной ПЦР [13, 14].

Таким образом, существует консенсус относительно роли гена *HMGA2* в процессах образования злокачественных опухолей, в том числе ЩЖ, однако выводы относительно применимости данного маркера для диагностических целей, полученные разными авторами, расходятся, что может быть связано не только с техническими особенностями используемых методов, но и со структурой анализируемых выборок. Следует подчеркнуть, что во всех упомянутых работах выборки включали относительно небольшую долю доброкачественных неопухолевых образований.

Результаты исследований последних лет показали, что при развитии разных опухолей ЩЖ существенно изменяется содержание целого ряда клеточных микроРНК, в том числе миРНК-221. Эта микроРНК высоко консервативна для позвоночных и у ряда млекопитающих, включая человека, кодируется X-хромосомой в тандеме с миРНК-222. Повышенная экспрессия миРНК-221 отмечена при ряде онкологических заболеваний [15]. К ее мишеням относится белок CD117, рецептор одной из тирозинкиназ [16], а также регулятор клеточного цикла p27Kip1 [17]. Нарушения экспрессии миРНК-221 могут приводить к нарушениям клеточного цикла и дедифференцировке, а также способствовать клеточной миграции и aberrantному ангиогенезу. Таким образом, миРНК-221 является классической онкогенной микроРНК.

Повышение содержания миРНК-221 при развитии опухолей ЩЖ впервые продемонстрировано более

10 лет назад [18] и позже подтверждено в ряде работ. Большинство этих исследований касалось ПР ЩЖ. В то же время показано, что повышенный уровень миРНК-221 характерен и для ФР ЩЖ как обычных, так и В-клеточных [19]. Также было продемонстрировано, что ФА ЩЖ различаются по уровню экспрессии миРНК-221: в классических ФА он не изменен (как и в доброкачественных образованиях), а в В-клеточных — повышен [19]. М. Dettmer и соавт. показали, что лишь для кластера миРНК-221/222 характерно выраженное увеличение содержания для разных типов рака ЩЖ, включая ПР и ФР [20]. Это позволило авторам предположить, что повышенная экспрессия любой из этих микроРНК может рассматриваться как универсальный маркер злокачественности клеток ЩЖ. В то же время в работе В. Wojtas и соавт. было продемонстрировано, что повышение уровня миРНК-221 при ФР, в отличие от ПР, не ассоциировано с инвазией и метастазированием и может являться ранним событием при трансформации фолликулярных клеток, происходящим уже на стадии доброкачественных новообразований [21].

Цель исследования — анализ экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК миРНК-221 с помощью ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) в выборке из 713 цитологических препаратов, полученных на стадии дооперационного типирования узлов ЩЖ, соответствующих в дальнейшем разным цитологическим заключениям.

Материалы и методы

Клинический материал. В работе использовали 713 цитологических образцов, полученных в период с 2014 по 2016 г. при проведении стандартной тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии в Центре новых медицинских технологий (г. Новосибирск) и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (г. Санкт-Петербург). В соответствии с законодательством России цитологический материал от каждого пациента был получен при наличии информированного согласия на его использование, все данные были депersonализованы. Образцы классифицированы в соответствии с системой Бетесда [22]: категория II по системе Бетесда: доброкачественные образования ($n = 375$); категория IV по системе Бетесда: фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль ($n = 143$); категория VI по системе Бетесда: медуллярный рак ($n = 7$), ПР ($n = 186$), анапластический рак ($n = 2$). Послеоперационные гистологические диагнозы для всех образцов нам не были доступны.

Выделение нуклеиновых кислот из цитологических препаратов и анализ содержания микроРНК выполняли, как описано ранее [23]. Нормировку уровня миРНК-221 проводили на содержание референсной миРНК-197 [24] по формуле: $2^{(Ct_{197} - Ct_{221})}$, где Ct — пороговый цикл реакции для соответствующей микроРНК.

Полуколичественная оценка содержания мРНК *HMGA2*. Для ОТ-ПЦР-РВ использовали специфические праймеры

и флуоресцентно меченные зонды для выявления мРНК гена *HMGA2* и гена домашнего хозяйства *PGK1* (фосфолицераткиназа), применяемого в качестве нормализатора. Все праймеры и зонды были синтезированы в АО «Вектор-Бест» (Россия). Олигонуклеотиды выбирали с использованием онлайн-сервиса PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index/>). Эффективность амплификации для каждой системы оценивали с помощью калибровочной кривой, построенной по разведениям очищенного препарата РНК, выделенной из операционного материала от пациента с ПР ЩЖ, в котором было выявлено высокое содержание мРНК *HMGA2*. Значение E для амплификации гена *PGK1* составило ~100 %, для гена *HMGA2* – ~99 %.

Последовательности олигонуклеотидов для детекции мРНК *HMGA2*:

HMGA2-F: 5'-TCCCTCTAAAGCAGCTCAAAA (прямой праймер);

HMGA2-R: 5'-ACTTGTTGTGGCCATTTCCT (обратный праймер);

HMGA2-P: 5'-(ROX)-CAGAAGCCAC (T-BHQ2) GGAGAAAACGGCCAA-p (флуоресцентно меченный зонд).

Последовательности олигонуклеотидов для детекции мРНК *PGK1*:

PGK-F: 5'-GGAGAACCTCCGCTTTCAT (прямой праймер);

PGK-R: 5'-GCTGGCTCGGCTTTAAC (обратный праймер);

PGK-P: 5'-(ROX)-TTCCAGAAAGCA (T-BHQ2) CTTTCCCTCCCTTCT-p (флуоресцентно меченный зонд).

Для проведения ОТ-ПЦР-РВ использовали термоциклер CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) и лиофилизованные смеси Мастер-микс ОТ-ПЦР (АО «Вектор-Бест», Россия). Температурный режим реакции: 45 °С – 30 мин, 94 °С – 2 мин, 50 циклов: денатурация при 94 °С – 10 с, отжиг и элонгация: 60 °С – 20 с. Концентрация праймеров в реакции – 0,5 мкМ, флуоресцентно меченного зонда – 0,25 мкМ.

Для оценки уровня экспрессии гена *HMGA2* использовали нормировку на ген домашнего хозяйства *PGK1*. Расчеты уровня относительной экспрессии

производили по формуле: $2^{(Ct_{PGK} - Ct_{HMGA})}$, где Ct – пороговый цикл реакции для соответствующей мРНК. Если для образца не было получено значений Ct для мРНК *HMGA2*, в то время как значения Ct для мРНК *PGK1* находились в пределах стандартных значений для цитологических препаратов ($Ct < 36$), экспрессию *HMGA2* в этом образце считали недетектируемой. Образцы с низким содержанием мРНК *PGK1* ($Ct > 36$) исключали из анализа.

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 9.1 (StatSoft Inc., США). Сравнение 2 независимых выборок по количественному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости был принят равным 0,05. Для расчета диагностических характеристик применяли ROC-анализ.

Результаты

На рис. 1 представлены относительные уровни экспрессии гена *HMGA2* в образцах с разными цитологическими диагнозами, на рис. 2 – медианные значения и диаграмма размаха.

Из рис. 1 и 2 видно, что для доброкачественных образований характерен относительно невысокий уровень экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 по сравнению с ПР. В образцах ПР содержание микроРНК-221 в среднем было выше в 6 раз, чем в образцах доброкачественных образований, а *HMGA2* – в 200 раз. Фолликулярные опухоли занимают промежуточное положение значений относительного уровня экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 по сравнению с другими группами. Статистическую значимость полученных различий определяли с помощью критерия Манна–Уитни, результаты представлены в табл. 1, из которой видно, что показанные нами различия в уровне экспрессии *HMGA2* и микроРНК-221 между доброкачественными образованиями, с одной стороны, и ПР, с другой стороны, статистически значимы.

Кроме того, статистически значимые различия выявлены между доброкачественными образованиями и фолликулярными опухолями, с одной стороны, и фолликулярными опухолями и ПР – с другой.

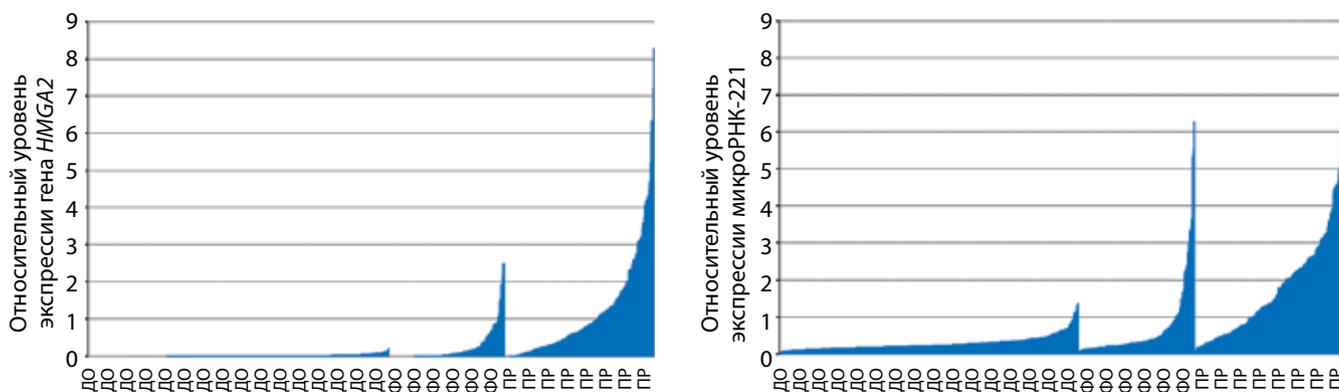


Рис. 1. Все значения относительных уровней экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 в порядке возрастания в цитологических образцах. ДО – доброкачественные образования ($n = 375$); ФО – фолликулярные опухоли ($n = 143$); ПР – папиллярный рак ($n = 186$)

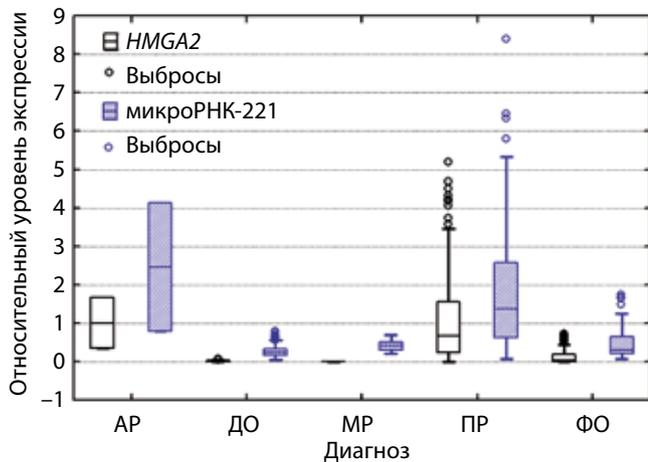


Рис. 2. Диаграмма размаха относительных уровней экспрессии гена *HMG2* и микроРНК-221 в цитологических образцах. Средняя линия обозначает медиану, «ящик» – интерквартильный размах, «усы» – минимальные и максимальные значения без выбросов; выбросы обозначены кружками. AP – анапластический рак; ДО – доброкачественные образования; MP – медулярный рак; PP – папиллярный рак; ФО – фолликулярные опухоли

Для оценки диагностических характеристик уровня экспрессии *HMG2* и миРНК-221 как диагностических маркеров, позволяющих дифференцировать доброкачественные неопухолевые образования и злокачественные опухоли, с использованием ROC-анализа, мы взяли 2 гомогенные в отношении признака доброкачественности/злокачественности группы образцов: доброкачественные образования и ПР. Результаты анализа приведены в табл. 2. Очевидно, что деление по уровню экспрессии *HMG2* обладает более высокими диагностическими характеристиками, чем по уровню экспрессии миРНК-221, что, возможно, связано с большим размахом значений уровня экспрессии *HMG2*.

При использовании отсечки значения относительного уровня экспрессии *HMG2*, равной 0,2, достигается максимальная (100 %) специфичность определения

образцов с ПР, чувствительность при этом составляет 79 %. Если применить эту отсечку к фолликулярным опухолям, то 24,5 % таких образцов попадают в группу с уровнем экспрессии *HMG2* >0,2, который рассматривается нами как повышенный и в которую не попадает ни одно доброкачественное образование (рис. 3).

Разница в уровне экспрессии гена *HMG2* между группами фолликулярных опухолей с его повышенным и «нормальным» содержанием достигает 85 раз, а разница в уровне экспрессии миРНК-221 между этими группами составляет в среднем 3 раза (рис. 4). При этом в существенной части (23 %) образцов фолликулярных опухолей с низким содержанием мРНК *HMG2*, а также в небольшой части образцов доброкачественных образований уровень миРНК-221 был повышен. Обратная ситуация (уровень миРНК-221 низкий, а уровень *HMG2* повышен) оказалась нехарактерной для нашей выборки.

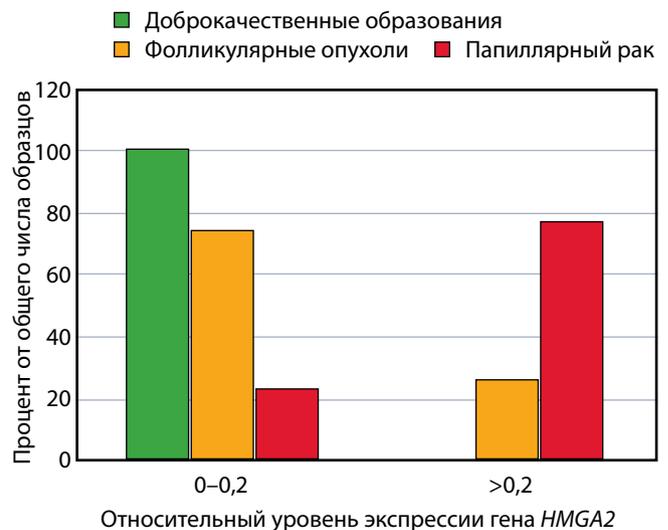


Рис. 3. Распределение образцов опухолей и образований щитовидной железы с разными цитологическими диагнозами по уровням экспрессии гена *HMG2* (повышен/не повышен)

Таблица 1. Парное сравнение разных групп опухолей щитовидной железы по уровню экспрессии гена *HMG2* и микроРНК-221 и значимость различий

Группа, количество образцов		Me (Q1–Q3) <i>HMG2</i>			Me (Q1–Q3) микроРНК-221		
1-я	2-я	1-я группа	2-я группа	<i>p</i>	1-я группа	2-я группа	<i>p</i>
ДО, 375	AP, 2	0,003 (0–0,016)	1,011 (0,36–1,66)	0,014	0,226 (0,171–0,328)	2,457 (0,789–4,130)	0,018
ДО, 375	MP, 7	0,003 (0–0,016)	0 (0–0,012)	0,310	0,226 (0,171–0,328)	0,426 (0,3–0,509)	0,010
ДО, 375	PP, 186	0,003 (0–0,016)	0,67 (0,24–1,55)	0	0,226 (0,171–0,328)	1,374 (0,624–2,570)	0
ДО, 375	ФО, 143	0,003 (0–0,016)	0,03 (0,0005–0,19)	5 × 10⁻¹¹	0,226 (0,171–0,328)	0,303 (0,212–0,650)	1 × 10⁻⁶
ФО, 143	PP, 186	0,03 (0,0005–0,19)	0,67 (0,24–1,55)	2 × 10⁻²³	0,303 (0,212–0,650)	1,374 (0,624–2,570)	3 × 10⁻²²

Примечание. Me (Q1–Q3) – медиана (межквартильный размах), жирным шрифтом выделены значимые различия. ДО – доброкачественные образования; AP – анапластический рак; MP – медулярный рак; PP – папиллярный рак; ФО – фолликулярные опухоли.

Таблица 2. ROC-анализ и диагностические характеристики уровня экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 при дифференцировании доброкачественных опухолей и папиллярного рака

Характеристика	<i>HMGA2</i>		микроРНК-221	
Площадь под ROC-кривой, %	94,6		92,7	
P_1	$1,6 \times 10^{-66}$		$6,3 \times 10^{-61}$	
95 % доверительный интервал	92,1–97,2		90,1–95,2	
Отсечка	0,0944	0,1962	0,4583	1,3698
Специфичность, %	97,9	100	89,3	100
Чувствительность, %	86,5	79,0	84,4	50,5
ПЦПР, %	95,3	100	79,7	100
ПЦОР, %	93,6	90,6	92,0	80,3

Примечание. P_1 – нулевая гипотеза (действительная площадь 0,5); ПЦПР – предсказательная ценность положительного результата; ПЦОР – предсказательная ценность отрицательного результата.

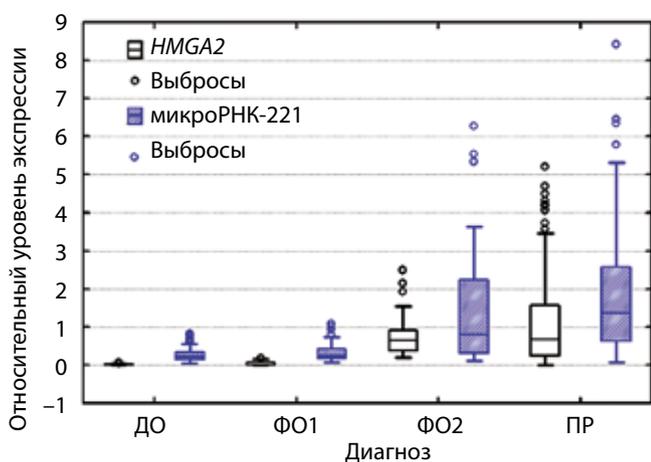


Рис. 4. Диаграмма размаха относительных уровней экспрессии гена *HMGA2* и микроРНК-221 в цитологических образцах доброкачественных образований, фолликулярных опухолей и папиллярного рака. Средняя линия обозначает медиану, «ящик» – интерквартильный размах, «усы» – минимальные и максимальные значения без выбросов; выбросы обозначены кружками. ДО – доброкачественные образования; ФО1 – фолликулярные опухоли с пониженным содержанием мРНК *HMGA2*; ФО2 – фолликулярные опухоли с повышенным содержанием мРНК *HMGA2*; ПР – папиллярный рак

Обсуждение

Несмотря на то, что роль повышения экспрессии гена *HMGA2* в развитии разнообразных злокачественных опухолей эпителиального происхождения хорошо известна и исследована, попытки использования уровня экспрессии *HMGA2* в качестве маркера злокачественных процессов в ЩЖ приводят к неоднозначным результатам. С одной стороны, выявление белков *HMGA2* с помощью иммуногистохимии [25, 26] либо экспрессии гена *HMGA2* с помощью ОТ-ПЦР [10–12, 25] в ряде работ позволило достоверно дифференцировать злокачественные и доброкачественные опухоли. С другой стороны, есть работы, в которых утверждается, что повышенная экспрессия гена *HMGA2* не является надежным диагностическим маркером [13, 14].

Несовпадение результатов разных работ может быть вызвано как применяемыми техниками анализа, так и различиями в составе проанализированных выборок и вкладом человеческого фактора (поскольку в качестве референсного метода используется гистологическое заключение, надежность которого существенно зависит от квалификации исполнителя).

Мы провели оценку возможности анализа экспрессии гена *HMGA2* в качестве способа дифференцирования злокачественных и доброкачественных опухолей и неопухолевых образований ЩЖ, используя собственные реактивы и наборы олигонуклеотидов для ОТ-ПЦР. Наши результаты, в целом близкие к результатам работ [11] и [12], указывают на то, что повышение уровня экспрессии *HMGA2* может быть характерно для карцином, происходящих из фолликулярных клеток ЩЖ, как высоко-, так и низкодифференцированных. Лишь в 1 из 7 медуллярных карцином, происходящих из парафолликулярных нейроэндокринных клеток (С-клеток), был зарегистрирован высокий уровень экспрессии *HMGA2*. В обеих анапластических (низкодифференцированных) карциномах уровень экспрессии *HMGA2* оказался значительно повышен. Это согласуется с данными других исследователей. Так, в работах [12, 25] обнаружено, что уровень экспрессии *HMGA2* был повышен во всех исследованных образцах анапластической карциномы.

ПР является самым распространенным типом рака ЩЖ, поэтому в нашей работе он также был представлен наибольшим количеством образцов. Для данной группы образцов уровень экспрессии гена *HMGA2* оказался повышен по сравнению с доброкачественными образованиями в среднем в 200 раз, что хорошо согласуется с результатами работы [10]. Повышенная экспрессия *HMGA2* выявлена нами в 86 % образцов ПР. Увеличение экспрессии *HMGA2* при ПР по сравнению с доброкачественными образованиями ЩЖ показано в ряде работ, хотя доля образцов ПР с повышенным

уровнем экспрессии этого гена в разных работах различается: 92 % [25], 77 % [11], а в работе [12] при классическом варианте ПР – 97 %, при фолликулярном варианте – 75 %, в среднем – 86 %. Эти различия можно объяснить особенностями проанализированных выборок, используемыми техниками анализа экспрессии *HMGA2*, а также выбранными значениями уровня экспрессии этого гена, рассматриваемыми как «повышенный».

Особенностью нашей выборки по сравнению с другими известными нам работами на эту тему является высокая доля доброкачественных неопухолевых образований. В реальном потоке образцов тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии, направляемых на цитологический анализ, именно доброкачественные образования (категория II по системе Бетесда) составляет подавляющее большинство. Поэтому оценка реальной предсказательной ценности молекулярного маркера (в нашем случае – уровня экспрессии гена *HMGA2*), на наш взгляд, не может быть корректной без анализа достаточной выборки доброкачественных образований. Полученные нами данные убедительно свидетельствуют, что уровень экспрессии *HMGA2* не превышает определенной величины в группе, относящейся ко II категории по системе Бетесда. Таким образом, выявление повышенного содержания этой мРНК обладает высокой (100 %) положительной предсказательной ценностью в отношении злокачественных опухолей (кроме ФР). Отрицательная предсказательная ценность такого анализа в отношении выявления злокачественных опухолей несколько ниже (89,3 %), поскольку для ряда случаев ПР, а также для большинства медуллярных раков повышение уровня мРНК *HMGA2* не выявлено.

В рамках проведенного исследования мы не могли оценить напрямую достоверные различия уровня экспрессии *HMGA2* между ФР (злокачественными опухолями) и ФА (доброкачественными опухолями), поскольку анализировали препараты, для которых было известно только цитологическое заключение, не позволяющее дифференцировать ФР и ФА. Таким образом, можно было предположить, что в отношении злокачественности группа фолликулярных опухолей является гетерогенной. И действительно, нами была выявлена очевидная неоднородность этой группы в отношении содержания как мРНК *HMGA2*, так и миРНК-221. При этом опухоли с повышенным содержанием мРНК *HMGA2*, как и ПР, характеризовались достоверно ($p = 0,0001$) повышенным уровнем экспрессии миРНК-221. Количественное соотношение 2 подгрупп образцов фолликулярных опухолей, отличающихся по уровню экспрес-

сии *HMGA2* (в 26 % таких образцов этот уровень был повышен, в 74 % повышение не наблюдалось, см. рис. 3), также соответствует известному из литературы соотношению доброкачественных и злокачественных опухолей, выявляемых среди образцов с цитологическим диагнозом, соответствующим IV категории по системе Бетесда. Согласно системе Бетесда [22] риск злокачественности для этой категории составляет 15–30 %.

Исходя из полученных результатов, у нас есть основания предполагать, что выявленная неоднородность экспрессии мРНК *HMGA2* и миРНК-221 в цитологических препаратах отражает гетерогенность выборки образцов фолликулярных опухолей: часть из них, с повышенным уровнем мРНК *HMGA2*, представлена преимущественно или исключительно злокачественными опухолями, а другая часть – доброкачественными (ФА). При этом уровень экспрессии миРНК-221 оказался повышен также и в некоторых образцах фолликулярных опухолей, для которых не обнаружено повышение экспрессии *HMGA2*. Доля таких образцов составила 23 %. Согласно данным литературы уровень миРНК-221 может быть повышен и в некоторых фолликулярных опухолях, не рассматриваемых как злокачественные [19]. В связи с этим диагностическая ценность этого маркера для выявления злокачественных опухолей ниже, чем ценность мРНК *HMGA2*.

Заключение

Таким образом, нами показано, что содержание мРНК онкогена *HMGA2* и онкогенной миРНК-221 достоверно отличается между ПР ЩЖ и доброкачественными образованиями (II категория по системе Бетесда), а также существенно варьирует в гетерогенной группе образцов, объединенных цитологическим диагнозом «фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль». При этом в одних фолликулярных опухолях содержание этих маркеров повышено в той же степени, что при ПР, а в других является относительно низким, что сближает их с доброкачественными образованиями. При этом для опухолей с повышенным содержанием мРНК *HMGA2* характерен также повышенный уровень экспрессии миРНК-221. Указанные различия могут быть выявлены на стадии дооперационного типирования узловых новообразований ЩЖ с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР. Это позволяет рассматривать мРНК *HMGA2* и, в меньшей степени, миРНК-221 как перспективные молекулярные маркеры, оценка содержания которых может способствовать повышению точности типирования новообразований ЩЖ на дооперационной стадии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований по темам 0310-2014-0002; 0310-2015-0003; 0310-2015-0007.

Financing. The study was conducted with financial support for basic scientific research under the projects 0310-2014-0002; 0310-2015-0003; 0310-2015-0007.

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

- Ghossein R. Problems and controversies in the histopathology of thyroid carcinomas of follicular cell origin. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(5):683–91.
- Baloch Z.W., Sack M.J., Yu G.H. et al. Fine-needle aspiration of thyroid: an institutional experience. *Thyroid* 1998;8(7):565–9.
- Pallante P., Sepe R., Puca F., Fusco A. High mobility group a proteins as tumor markers. *Front Med (Lausanne)* 2015;2:15.
- Cleynen I., Van de Ven W.J. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 2008;32(2):289–305.
- Wang X., Liu X., Li A.Y. et al. Overexpression of *HMGA2* promotes metastasis and impacts survival of colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2570–80.
- Ding X., Wang Y., Ma X. et al. Expression of *HMGA2* in bladder cancer and its association with epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Prolif* 2014;47(2):146–51.
- Chiappetta G., Tallini G., De Biasio M.C. et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 1998;58(18):4193–8.
- Raskin L., Fullen D.R., Giordano T.J. et al. Transcriptome profiling identifies *HMGA2* as a biomarker of melanoma progression and prognosis. *J Invest Dermatol* 2013;133(11):2585–92.
- Malek A., Bakhidze E., Noske A. et al. *HMGA2* gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. *Int J Cancer* 2008;123(2):348–56.
- Belge G., Meyer A., Klemke M. et al. Up-regulation of *HMGA2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(1):56–63.
- Lappinga P.J., Kip N.S., Jin L. et al. *HMGA2* gene expression analysis performed on cytologic smears to distinguish benign from malignant thyroid nodules. *Cancer Cytopathol* 2010;118(5):287–97.
- Jin L., Lloyd R.V., Nassar A. et al. *HMGA2* expression analysis in cytological and paraffin-embedded tissue specimens of thyroid tumors by relative quantitative RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2011;20(2):71–80.
- Nagar S., Ahmed S., Peeples C. et al. Evaluation of genetic biomarkers for distinguishing benign from malignant thyroid neoplasms. *Am J Surg* 2014;207(4):596–601.
- Берёзкина И.С., Саприна Т.В., Зима А.П. и др. Исследование галектина-3, Ki-67, убиквитина, *HMGA2* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в пункционном материале при узловом зобе. Клиническая и экспериментальная тиреоидология 2016;12(2):19–27. [Berezkina I.S., Saprina T.V., Zima A.P. et al. The study of galectin-3, Ki-67, ubiquitin, *HMGA2* by polymerase chain reaction in real time (RT-PCR) in the puncture specimens of nodular goiter. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya = Clinical and Experimental Thyroidology* 2016;12(2):19–27. (In Russ.)].
- Garofalo M., Quintavalle C., Romano G. et al. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Curr Mol Med* 2012;12(1):27–33.
- Urbich C., Kuehbach A., Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Res* 2008;79(4):581–8.
- Galardi S., Mercatelli N., Giorda E. et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27kip1. *J Biol Chem* 2007;282(32):23716–24.
- He H., Jazdzewski K., Li W. et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):19075–80.
- Nikiforova M.N., Tseng G.C., Steward D. et al. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1600–8.
- Dettmer M., Vogetseder A., Durso M.B. et al. MicroRNA expression array identifies novel diagnostic markers for conventional and oncocytic follicular thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(1):E1–7.
- Wojtas B., Ferraz C., Stokowy T. et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 2014;388(1–2):1–9.
- Cibas E.S., Ali S.Z. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Am J Clin Pathol* 2009;132(5):658–65.
- Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V. et al. miRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors. *BMC Cancer* 2016;16:201.
- Titov S.E., Demenkov P.S., Ivanov M.K. et al. Selection and validation of miRNAs as normalizers for profiling expression of microRNAs isolated from thyroid fine needle aspiration smears. *Oncol Rep* 2016;36(5):2501–10.
- Chiappetta G., Ferraro A., Vuttariello E. et al. *HMGA2* mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 2008;44(7):1015–21.
- Jang M.H., Jung K.C., Min H.S. The diagnostic usefulness of *HMGA2*, Survivin, CEACAM6, and SFN/14-3-3 δ in follicular thyroid carcinoma. *J Pathol Transl Med* 2015;49(2):112–7.

Статья поступила: 30.10.2017. Принята в печать: 09.11.2017.

Article received: 30.10.2017. Accepted for publication: 09.11.2017.

Ранняя диагностика и тотальная гастрэктомия при наследственном диффузном раке желудка

Л.Н. Любченко, М.Г. Филиппова, О.А. Анурова, П.Б. Назлиев, И.С. Стилиди, М.М. Давыдов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Людмила Николаевна Любченко clingen@mail.ru

Представлено сообщение о редком случае наследственного диффузного рака желудка, ассоциированного с мутацией в гене *E-кадгерина 1 (CDH1)*, впервые описанной в российской популяции. В феврале 2013 г. за медико-генетической консультацией в лабораторию клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России обратилась пациентка 28 лет в связи сотягощенным семейным анамнезом в отношении рака желудка. По результатам молекулярно-генетического исследования у пациентки обнаружена мутация в гене *CDH1*, определяющая более чем 80 % риск заболеть диффузным раком желудка в течение жизни. При гистологическом исследовании материала биопсии слизистой оболочки желудка, выполненной во время проведения эзофагогастроуденоскопии, выявлены единичные фокусы перстневидно-клеточного рака в собственной пластинке слизистой оболочки желудка. В отделении абдоминальной онкологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России выполнена спленосохраняющая гастрэктомия по Ру с формированием тонкокишечного резервуара, лимфодиссекция D2.

Ключевые слова: наследственный диффузный рак желудка, ген *CDH1*, гастрэктомия, молекулярно-генетическая диагностика

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-32-36

Early diagnostics and total gastrectomy of hereditary diffuse gastric cancer

L.N. Lyubchenko, M.G. Filippova, O.A. Anurova, P.B. Nazliev, I.S. Stilidi, M.M. Davydov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The case report describes a rare case of hereditary diffuse gastric cancer, associated with a *CDH1* gene mutation and reported in the Russian population for the first time. In February 2013, after a medical genetic counseling in the laboratory of clinical oncogenetics of the Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia the 28 years old patient was applied to due to a family history of gastric cancer. Based on the results of the molecular genetic study, the mutation in the *CDH1* gene was found, which determines the risk of diffuse gastric cancer during life beyond 80 %. Histological examination of the material of the gastric mucosa biopsy performed during the esophagogastroduodenoscopy revealed single foci of the ring-cell cancer in the intrinsic plate of the gastric mucosa. In the department of abdominal oncology, the Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia a splash-preserving gastrectomy for Roux was performed with the formation of a small intestine tank, lymphodissection D2.

Key words: hereditary diffuse gastric cancer, *CDH1* gene, gastrectomy, molecular-genetic analysis

Большинство случаев рака желудка носит спорадический характер, однако 1–3 % возникает в составе синдромов с высокой наследственной предрасположенностью к данному заболеванию [1]. Наследственный рак желудка наиболее часто представляет собой диффузный тип, или Linitis Plastica, и обычно называется наследственным диффузным раком желудка (НДРЖ).

Для отнесения семьи к категории пациентов с НДРЖ Международный консорциум по раку желудка (International Gastric Cancer Linkage Consortium, IGCLC) формулирует следующие критерии:

- два и более документально подтвержденных случая диффузного рака желудка у родственников I или II степени родства, из которых хотя бы один диагностирован в возрасте до 50 лет;

- три или более документально подтвержденных случая диффузного рака желудка у родственников I или II степени родства независимо от возраста возникновения заболевания [2, 3].

НДРЖ ассоциирован с герминальными мутациями в гене *E-кадгерина 1 (CDH1)* (OMIM 137215) [4]. Продукт гена — эпителиальный кадгерин — относится к семейству классических кадгеринов, является трансмембранным гликопротеином, который экспрессируется в различных тканях, участвует в Ca^{2+} -зависимой межклеточной адгезии, обеспечивает нормальную архитектуру эпителиальных клеток и формирование тканей. Помимо этого, *E-кадгерин* выступает в роли гена-супрессора опухолевого роста и опухолевой прогрессии.

Ген *CDH1* локализуется на хромосоме 16q22.1, охватывая объем около 100 Кб. *CDH1* содержит 16 экзонов

и 15 интронов и очень схож у различных биологических видов. Е-кадгерин — это 120 кДа гликопротеин, состоящий из экстрацеллюлярного домена (5 tandemных повторов), цитоплазматического домена и одного трансмембранного домена. Экстрацеллюлярный домен имеет сайт для связывания Ca^{2+} и выходит на клеточную поверхность для связывания с кадгерином соседней клетки путем боковой димеризации. Это приводит к установлению кадгерин-кадгериновой связи и в результате — к межклеточной адгезии. Цитоплазматический домен состоит из околочелюстного домена и катенинсвязывающего домена, каждый по 30–35 аминокислотных остатков. Околочелюстный домен приводит к кластеризации кадгеринов и усиливает адгезию с помощью p120-катенина. Катенинсвязывающий домен взаимодействует с бета-катенином и гамма-катенином (гомологи плакоглобина). Альфа-глобулин (гомолог винкулина) может связывать бета-катенин с актиновым цитоскелетом (рис. 1). Это способствует кластеризации белков и стабилизирует клеточную адгезию. С-конец цитоплазматического домена состоит из 150 остатков, включая катенинсвязывающий домен, и играет важную роль в кальцийзависимой клеточной агрегации. Помимо этого, кадгерин-катениновый комплекс может активировать некоторые внутриклеточные сигнальные каскады и играет важную роль в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода: потеря Е-кадгерина является одним из основных факторов, инициирующих эпителиально-мезенхимальный переход [5].

Около 25–30 % семей с НДРЖ согласно критериям IGCLC имеют конституциональные повреждения гена *CDH1* [4]. На сегодняшний день в гене *CDH1* описано более 100 мутаций в семьях, относящихся к различным этническим группам [6]. Мутации в гене *CDH1*, возникшие *de novo*, идентифицированы также в спорадических случаях раннего рака желудка как минимум у 4 % пациентов с возрастом манифестации до 35 лет. Герминальные мутации в гене *CDH1* имеют высокую пенетрантность: риск развития рака в течение жизни составляет 67 % у мужчин и 83 % у женщин. Средний возраст постановки диагноза составляет 38–40 лет и варьирует от 14 до 85 лет [7].

Клинический случай

Пациентка М., 28 лет, обратилась в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за медико-генетической консультацией в связи с наличием в семейном анамнезе случаев заболевания раком желудка в молодом возрасте (рис. 2). После проведения формально-генетического анализа в лаборатории клинической онкогенетики было выполнено молекулярно-генетическое исследование — определение кодирующей части гена-супрессора *CDH1*, вовлеченного в канцерогенез НДРЖ. Материалом исследования являлась ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови. В результате использования методов конформационно-чувствительного гель-электрофореза и последующего секвенирования по Сэнгеру в экзоне 7 гена *CDH1* выявлена герминальная

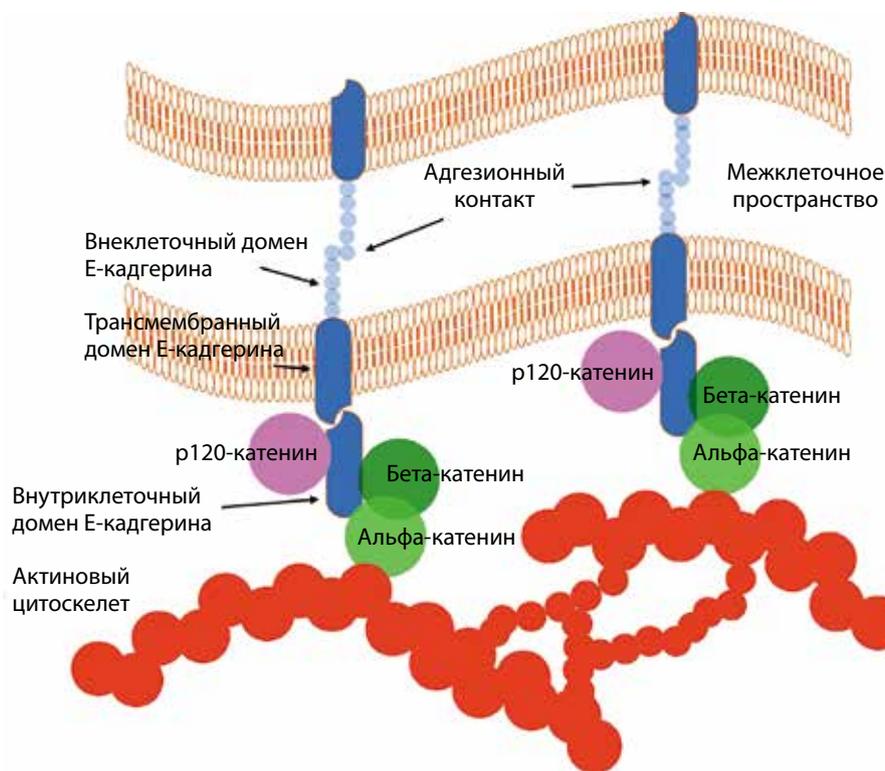


Рис. 1. Межклеточная адгезия с участием гена *E-кадгерина*. Экстрацеллюлярный домен связывается с экстрацеллюлярным доменом *E-кадгерина* на соседней клетке с помощью Ca^{2+} -активируемой димеризации. Интрацеллюлярный домен связан с р120-катенином и бета-катенином. Комплекс, формируемый бета-катенином, позволяет альфа-катенину связываться с актиновым цитоскелетом (адаптировано из [5])

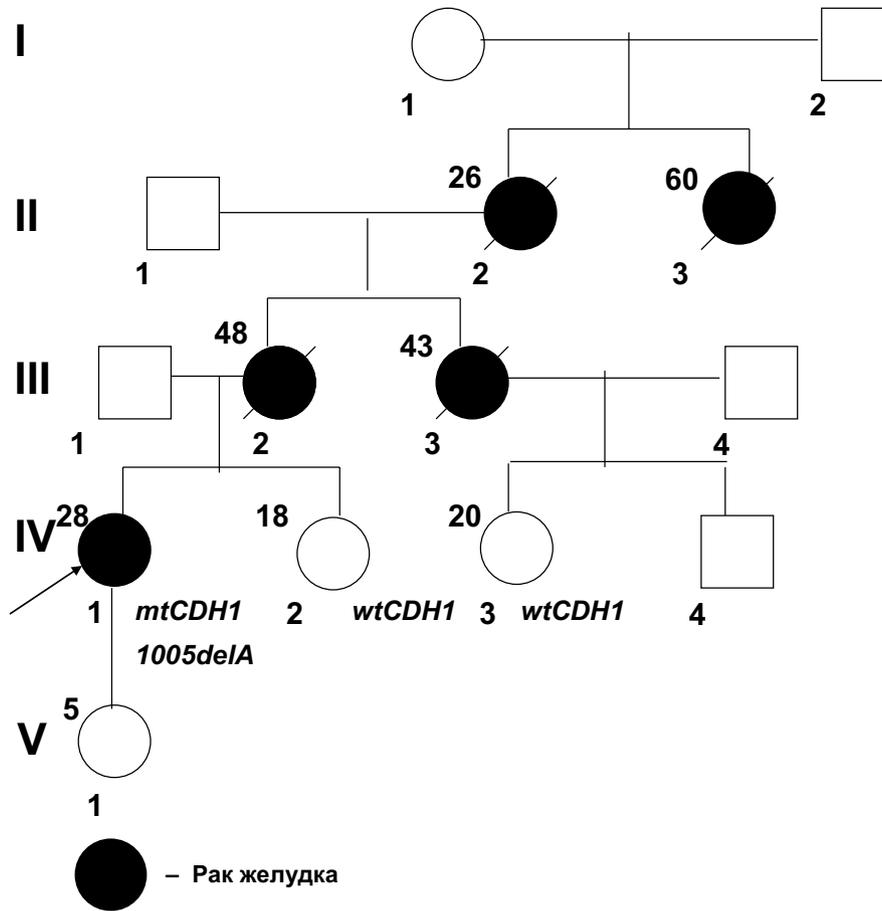


Рис. 2. Родословная пациентки М. с наследственным диффузным раком желудка. *mtCDH1* – мутация в гене *CDH1* 1005delA; *wtCDH1* – мутация в гене *CDH1* отсутствует

делеторная мутация *c.1005delA*, приводящая к сдвигу рамки считывания и остановке синтеза белка. Заключение: с учетом высокой пенетрантности гена *CDH1* риск развития наследственного *CDH1*-ассоциированного диффузного рака желудка в течение жизни составляет ~80%. Риск возникновения рака молочной железы (инфильтративно-долькового варианта) значительно превышает общепопуляционный и составляет 60%. Риск развития рака толстой кишки также значительно превышает общепопуляционный, что определяет необходимость динамического наблюдения в условиях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Риск наследования герминальной мутации родственниками I степени родства с учетом аутосомно-доминантного типа составляет 50%. Согласно рекомендациям IGCLC обосновано проведение тотальной гастрэктомии в профилактических целях. Также в плане динамического наблюдения рекомендованы: ультразвуковая компьютерная томография, маммография и/или магнитно-резонансная томография молочных желез; консультация генетика, гастроэнтеролога, маммолога, проктолога, диетолога; ДНК-диагностика родственников I степени родства.

Одновременно с проведением молекулярно-генетического исследования выполнена плановая эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС), при которой обнаружена опухоль

в антральном отделе желудка. По результатам гистологического заключения выявлены единичные фокусы перстневидно-клеточного рака в собственной пластинке слизистой оболочки желудка. Для дообследования и лечения больная госпитализирована в абдоминальное отделение НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Операция в объеме спленосохраняющей гастрэктомии с формированием тонкокишечного резервуара по Ру, лимфодиссекция D2 выполнена 14.03.2013. Заключение гистологического исследования операционного материала (от 05.04.2013): гистологическая картина и результаты иммуногистохимического исследования соответствуют инвазивному перстневидно-клеточному раку пилорического отдела желудка, растущему в пределах собственной пластинки слизистой оболочки (ранний рак желудка) с наибольшим размером $0,9 \times 0,2 \times 0,1$ см (по данным микроскопии), без признаков сосудистой инвазии, без метастазов (рис. 3). Гиперэкспрессия *Her2-neu* не выявлена («0»). Индекс пролиферации *Ki67* – 22%.

Пациентка находится под наблюдением врача-онколога в течение 53 мес. В 1-м полугодии после хирургического лечения отмечались умеренная потеря массы тела, демпинг-синдром средней степени выраженности, которые в дальнейшем компенсировались. По данным клинического

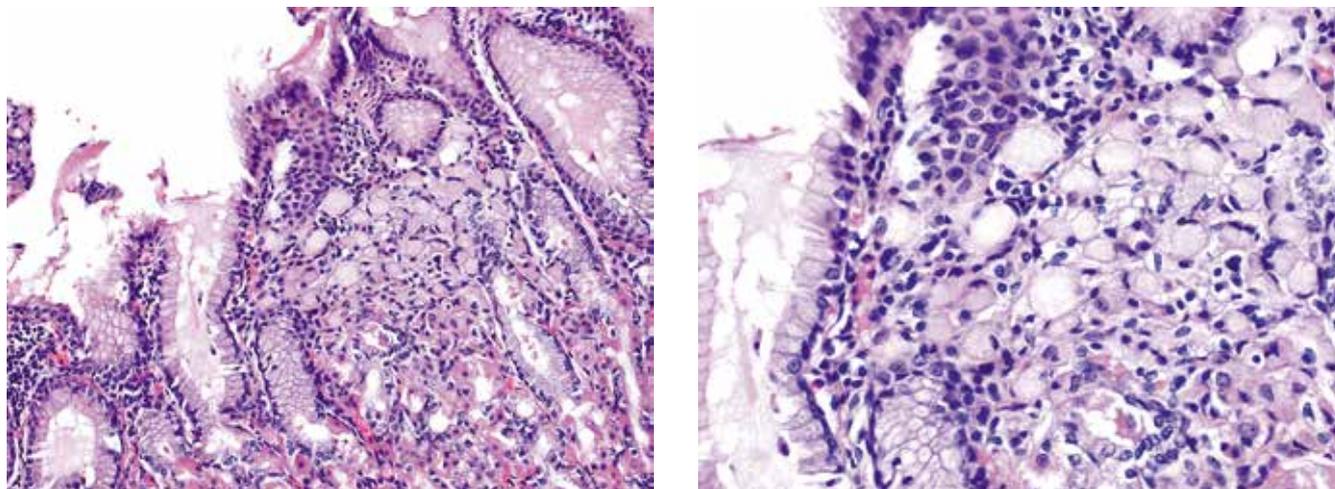


Рис. 3. Послеоперационный препарат пациентки М.: гистологическая картина диффузного перстневидно-клеточного рака желудка

обследования от 21.07.2017 – без прогрессирования основного заболевания.

Обсуждение

Родословная пациентки представляет собой редкий случай семьи, полностью удовлетворяющей критериям семей – НДРЖ (см. рис. 2). Герминальная мутация *c.1005delA*, которую пациентка, вероятнее всего, унаследовала от матери, в России описана впервые [8]. Из доступных для обследования родственников молекулярно-генетическое тестирование на предмет наличия мутации *c.1005delA* в гене *CDH1* проведено сибсам I и II степени родства (IV-2, IV-3), у которых мутация не обнаружена.

В работе, обобщившей 38 публикаций, посвященных анализу выполненных операций в объеме тотальных гастрэктомий у носителей мутаций в гене *CDH1*, приведены следующие данные. У 106 (62,7 %) из 169 пациентов, которым проведено хирургическое вмешательство, на предоперационном этапе симптомов заболевания не было, диагноз НДРЖ до операции был подтвержден у 21 (12,4 %) больного, данные о 42 пациентах отсутствовали. По результатам послеоперационного гистологического исследования перстневидно-клеточный рак выявлен у 147 (87,0 %) пациентов и не обнаружен только у 17 (10,0 %) [9].

Представленный клинический случай относится к редким ситуациям, когда диагноз раннего НДРЖ подтвержден при плановой ЭГДС, при этом динамическое наблюдение проводилось регулярно на основании отягощенного семейного анамнеза и в связи с возникновением заболевания у родственников в молодом возрасте.

Однако из опубликованных данных видно, что в большинстве случаев перстневидно-клеточный рак

остается недиагностированным даже при повторных ЭГДС и биопсиях. Двухлетняя выживаемость у пациентов, не имевших клинических признаков онкологического заболевания до проведения профилактической гастрэктомии (ПГЭ), составила 100 %, тогда как среди пациентов с наследственным диффузным перстневидно-клеточным раком, выявленным до операции, не превышала 40 % [10]. Высокий (>80 %) риск возникновения НДРЖ, недостаточная эффективность регулярных ЭГДС и доказательство наличия микроскопических фокусов перстневидно-клеточного рака у большинства носителей мутаций в полной мере делают оправданным проведение ПГЭ у носителей мутаций в гене *CDH1* с отягощенным семейным анамнезом [9, 10]. Оптимальный возраст выполнения ПГЭ у таких пациентов является предметом обсуждения. Необходимо принимать во внимание, что не оправдано проведение ПГЭ до окончательного формирования организма, как минимум до 20 лет. С другой стороны, пациенты с выявленным перстневидно-клеточным раком в возрасте около 40 лет имеют всего лишь 10 % вероятность благоприятного течения заболевания [11].

По разным данным, смертность, ассоциированная с ПГЭ, в целом колеблется от 0 до 6 %, и для молодых пациентов без симптомов до выполнения операции составляет меньше 1 %.

Таким образом, носителям мутаций в гене *CDH1* с семейным накоплением случаев НДРЖ и других злокачественных новообразований с учетом высокого риска развития заболевания в течение жизни, поздней клинической выявляемости и неблагоприятного прогноза показано проведение ПГЭ в целях снижения заболеваемости и смертности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

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

1. Le Vecchia C., Negri E., Franceschi S., Gentile A. Family history and risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 1992;70(1):50–5.
2. Caldas C., Carneiro F., Lynch T.H. et al. Family gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999;36(12):873–80.
3. Fitzgerald R.C., Hardwick R., Huntsman D. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Med Genet* 2010;47(7):436–44.
4. Guilford P., Hopkins J., Harraway J. et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998;392(6674):402–5.
5. Gall T.M., Frampton A.E. Gene of the month: *E-cadherin (CDH1)*. *J Clin Pathol* 2015;66(11):928–32.
6. Corso G., Marrelli D., Pascale V. et al. Frequency of CDH1 germline mutations in gastric carcinoma coming from high- and low-risk areas: metanalysis and systematic review of the literature. *BMC Cancer* 2012;12:8.
7. Pharoah P.D., Guilford P., Caldas C. et al. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carries from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001;121(6):1348–53.
8. Цуканов А.С., Шельгин Ю.А., Кашников В.Н. и др. Молекулярно-генетическое исследование наследственной предрасположенности к диффузному раку желудка у российских пациентов. *Вопросы онкологии* 2013;59(5):580–4. [Tsukanov A.C., Shelygin Yu.A., Kashnikov V.N. et al. Molecular genetics study of hereditary predisposition to diffuse gastric cancer in Russian patients. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2013;59(5):580–4. (In Russ.)].
9. Seevaratnam R., Coburn N., Cardoso R. et al. A systematic review of the indications for genetic testing and prophylactic gastrectomy among patients with hereditary diffuse gastric cancer. *Gastric Cancer* 2012;15(1):153–63.
10. Chen Y., Kingham K., Ford J.M. et al. A prospective study of total gastrectomy for CDH1-positive hereditary diffuse gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18(9):2594–8.
11. Blair V., Shaw D., Martin H. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:262–75.

Статья поступила: 30.10.2017. Принята в печать: 09.11.2017.

Article received: 30.10.2017. Accepted for publication: 09.11.2017.

К вопросу о гистогенезе опухоли почечной капсулы, индуцированной 1,2-диметилгидразином у мышей СВА

О. В. Морозова¹, Е. Е. Антошина¹, В. Н. Манских²

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»; Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

Контакты: Ольга Викторовна Морозова canceragent@gmail.com

Введение. У самцов мышей линии СВА 1,2-диметилгидразин (ДМГ) индуцирует андрогензависимую гемангиосаркому (ГАС) фиброзной почечной капсулы (ПК). Эта экспериментальная модель используется для изучения гормонозависимых опухолей. Полагают, что ПК, в которой развивается ГАС, не имеет сосудов. Для разъяснения природы такого парадоксального феномена мы изучали гистогенез этой опухоли.

Материалы и методы. Самцы мышей линии СВА получили 15 подкожных инъекций ДМГ. Длительность эксперимента составила 50 нед. Были приготовлены парафиновые срезы и пленчатые препараты ПК. Для исследования предшественников эндотелия и стволовых клеток проводили иммуногистохимическую реакцию с антителами CD34.

Результаты. Мы обнаружили отдельные клетки и редкие капиллярные структуры с выраженной экспрессией CD34 в интактной ПК. Тем не менее в начальных ГАС CD34 экспрессировался слабо по сравнению с интактной ПК или не экспрессировался вовсе. На поздних стадиях развития отмечена интенсивная экспрессия CD34.

Заключение. В результате мы впервые показали, что фиброзная ПК мыши не является полностью бессосудистым образованием, как полагали ранее. В процессе морфогенеза ГАС обнаружены фазовые изменения экспрессии антигена CD34.

Ключевые слова: 1,2-диметилгидразин, мыши линии СВА, почечная капсула, гемангиосаркома, гистогенез, иммуногистохимия

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-37-41

About renal capsule tumour histogenesis, induced by 1,2-dimethylhydrazine in CBA mice

O. V. Morozova¹, E. E. Antoshina¹, V. N. Manskikh²

¹Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University; Build. 73, 1 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia

Background. It is accepted that 1,2-dimethylhydrazine (DMH) induced androgen-dependent hemangiosarcoma (HAS) of fibrous renal capsule (RC) in CBA male mice. This experimental model is used to study hormone-dependent tumors. It is considered that RC (site of HAS growth) is avascular. For clarifying the nature of such paradoxical phenomenon we studied the tumour histogenesis.

Materials and methods. CBA male mice received 15 subcutaneous injections of DMH. The duration of the experiment was 50 weeks. From RC whole-mounted preparations and paraffin sections were made. Immunohistochemistry method with antibody against endothelium and stem cells CD34 were used to investigate the endothelium cell precursors.

Results. We have found single CD34 well expressive cells and capillary structures in intact RC. Nevertheless on the initial stages of HAS growth the CD34 expression was markedly weaker or completely absent compared with intact RC. In the late HAS develop the intensive CD34 expression was detected.

Conclusions. In summary, for the first time we have shown that murine fibrous RC is not completely avascular education, as it was supposed earlier. In the HAS morphogenesis process the phase alterations of CD34 antigen expression were found.

Key words: 1,2-dimethylhydrazine, mouse CBA, renal capsule, hemangiosarcoma, histogenesis, immunohistochemistry

Введение

Ранее была получена модель андрогензависимой опухоли почечной капсулы (ПК), индуцированной 1,2-диметилгидразином (ДМГ) у мышей-самцов линии СВА/Лас [1]. Выявлены резко выраженные различия в частоте возникновения этой опухоли у мышей разного пола и линий [2]. У мышей-самцов линии СВА ДМГ в большинстве (70–100 %) случаев индуцирует опухоли

ПК, в то время как у самок эти опухоли не возникают или возникают редко (1–2 %) [1]. Предварительная кастрация самцов предотвращает индукцию, а введение тестостерона пропионата (ТП) кастрированным самцам восстанавливает развитие опухолей ПК под действием ДМГ [2]. У овариэктомированных самок линии СВА одновременное введение ДМГ и ТП вызывает развитие этих опухолей в большинстве случаев [3].

Гистогенез опухоли был исследован, и она была определена как злокачественная сосудистая опухоль — гемангиосаркома (ГАС) (синонимы: ангиосаркома, злокачественная гемангиоэндотелиома) [4]. Удивительно, что эта сосудистая опухоль возникает *de novo* в бессосудистом органе — фиброзной ПК. У человека опухоли фиброзной ПК появляются редко, в основном это фибросаркома или лейомиосаркома, но сосудистые опухоли не встречаются [5]. Изучали морфогенез и гистогенез ГАС, индуцированной ДМГ у мышей, в результате был описан процесс ее возникновения и развития [6]. Авторы утверждают, что под действием ДМГ происходит образование атипичных эндотелиальных клеток в ПК, из которых затем формируется опухоль. Визуально опухоли появляются в виде телеангиоэктазий, затем в виде кисты, заполненной кровью, далее стенки полости утолщаются за счет разрастания опухолевого эндотелия. В некоторых случаях стенки опухоли прорываются, и кровь изливается в брюшную полость, что вызывает гибель животного. Иногда опухоль прорастает в ткань почки. Отсутствие эндотелия в нормальной ПК определяли методом импегрированного серебра, опухолевый эндотелий — с помощью световой и электронной микроскопии. Авторы сделали предположение о том, что ГАС может возникать из полипотентных клеток ПК.

В связи с тем, что данная экспериментальная модель используется для изучения гормонозависимой опухоли, появилась необходимость в дальнейшем уточнении ее происхождения и дополнительном изучении морфогенеза этой парадоксальной опухоли. В предыдущих исследованиях нами показано, что экспрессия *VEGFA* в ПК мышей линии СВА на ранних стадиях ДМГ-канцерогенеза не наблюдалась, тогда как на поздних стадиях обнаруживается его слабая экспрессия. Однако экспрессии основного рецептора *VEGFAR2* в образцах ПК ни на ранних этапах канцерогенеза, ни в опухолях не выявлено [7]. Сложность этого исследования заключается в том, что ПК плотно сращена с жировой капсулой, в которой имеются сосуды. Жировая ткань неизбежно попадает в образцы, особенно у возрастных мышей. Присутствие жировой ткани и вместе с ней, вероятно, эндотелия может искажать результат исследования полимеразной цепной реакции. Поэтому потребовалось применение другого метода исследования.

В настоящей работе иммуногистохимическим (ИГХ) методом мы попытались исследовать развитие ГАС, используя маркер эндотелия и стволовых клеток соединительной ткани CD34.

Материалы и методы

В эксперименте использованы 44 3-месячных самца мышей линии СВА/Лас, содержащихся в стандартных условиях и полученных из лаборатории экспериментальной биологии «Виварий» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Водный раствор ДМГ вводили подкожно 1 раз в неделю в дозе 8 мг/кг в течение 15 нед. Животных разделили на 2 группы: 1-я ($n = 34$) получала ДМГ; 2-я ($n = 10$) — контрольная (интактные животные). Длительность эксперимента — 50 нед.

При некропии выделяли ПК под бинокулярной лупой, готовили пленчатые (whole-mounted) препараты, фиксировали метиловым спиртом и для детекции эндотелия проводили иммуноокрашивание с моноклональными антителами к CD34 (553731, BD Biosciences Pharmingen, США). Связывание первичных антител детектировалось с помощью меченных биотином антикрысиных вторичных антител (559286, BD Biosciences Pharmingen, США) с последующей обработкой препарата стрептавидином — HRP (K0690, Dako, Дания).

При обнаружении видимых опухолей почку с капсулой фиксировали в 10 % нейтральном формалине в течение 24 ч и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. ИГХ-анализ проводили с антителами к CD34 по той же методике, что и с пленчатыми препаратами. Для исключения неспецифического связывания антител поставлены соответствующие контрольные эксперименты, результат которых был отрицательным.

Результаты

Все мыши дожили до окончания эксперимента. В 1-й группе опухоли ПК были обнаружены у 28 (82,4 %) из 34 самцов. Метастазы не выявлены. У 10 мышей 2-й группы опухоли не обнаружены. При микроскопическом исследовании отмечены кавернозные гемангиомы с атипией (начальные опухоли) и злокачественные ГАС с различной степенью дифференцировки. Низкодифференцированные опухоли зачастую были представлены солидными участками с большим количеством митозов, в том числе патологических. Гистологическая картинка индуцированных опухолей соответствовала ранее описанными ГАС [8].

При ИГХ-исследовании пленчатые препараты ПК мышей 2-й группы при иммуноокрашивании антителами к CD34 оказались отрицательными (рис. 1а, б). В пленчатых препаратах капсул мышей 1-й группы, но без опухолей белок CD34 также не экспрессировался (рис. 1в).

В парафиновых препаратах интактной ПК обнаруживались отдельные клетки с выраженной экспрессией антигена CD34 и редкие капиллярные структуры, которые могут быть предшественниками ГАС ПК (рис. 2). По-видимому, отрицательный результат в препаратах whole-mounted связан с многослойностью ПК и сложностью проведения ИГХ-реакции. Таким образом, ПК не является полностью аваскулярным образованием, как полагали ранее.

На начальных стадиях развития ГАС, представленной в виде небольших телеангиэктазий, антиген CD34 в эндотелиальных клетках опухоли экспрессировался заметно слабее (слабая окраска), чем в интактной

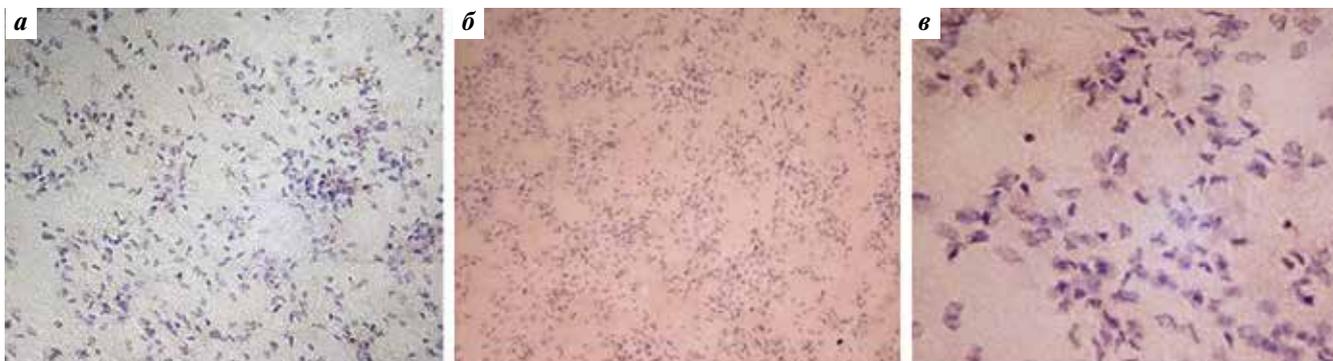


Рис. 1. Фиброзная почечная капсула, пленчатые препараты: а – капсула интактной мыши (окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$); б – капсула интактной мыши, пленчатый препарат (окрашивание с антителами к CD34, $\times 100$): отсутствие положительного окрашивания; в – капсула мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином, пленчатый препарат (окрашивание с антителами к CD34, $\times 200$): отсутствие положительного окрашивания



Рис. 2. Почечная капсула интактной мыши: положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 в почечной капсуле ($\times 1000$)

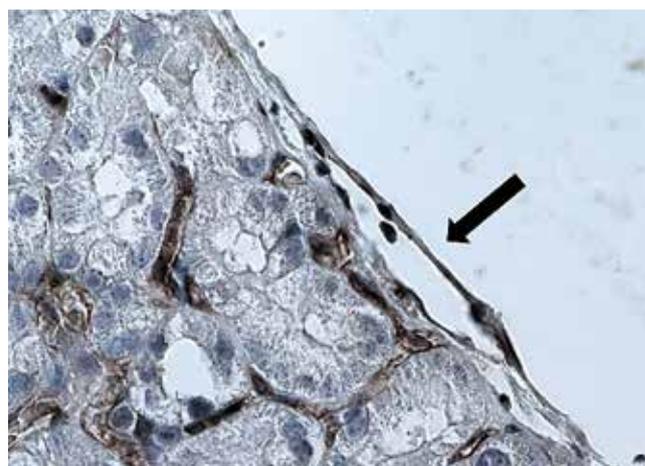


Рис. 3. Почечная капсула мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином: слабая положительная иммуногистохимическая реакция на CD34, но выраженная в субкапсулярной зоне ($\times 1000$)

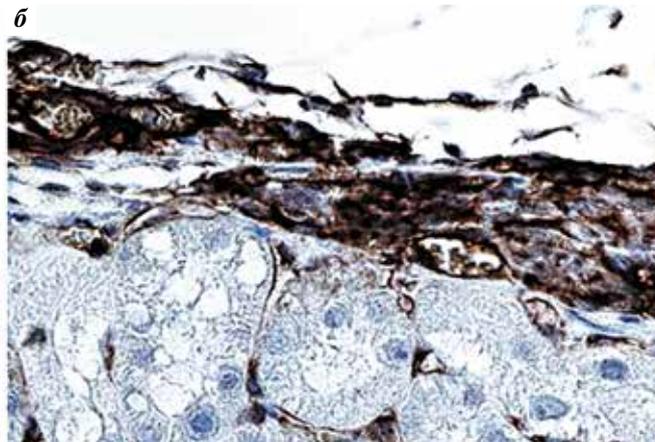
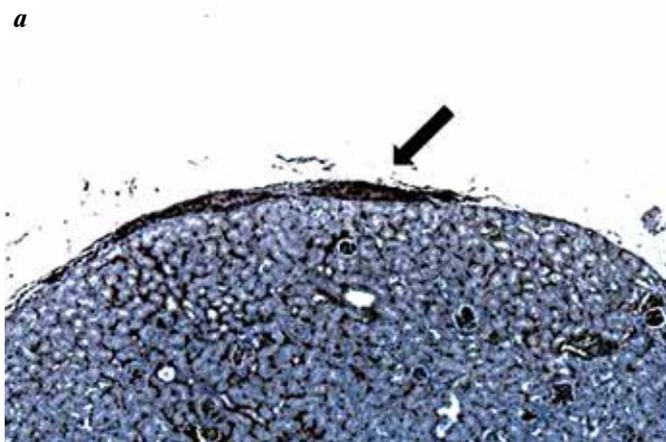


Рис. 4. Сплошная гемангиосаркома почечной капсулы мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином: положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 ($\times 100$ (а); $\times 1000$ (б))

капсуле, в некоторых участках положительное окрашивание CD34 полностью отсутствовало (рис. 3). В развившихся ГАС ПК мы наблюдали интенсивное иммуноокрашивание CD34 в клетках опухолей различного строения (рис. 4, 5).

Примечательно то, что мы обнаружили развитие ГАС не только непосредственно в ПК, но и в субкапсулярной зоне почки (рис. 6а). Также мы наблюдали отчетливо выраженную экспрессию белка CD34 в кортикальной зоне почки, что указывает

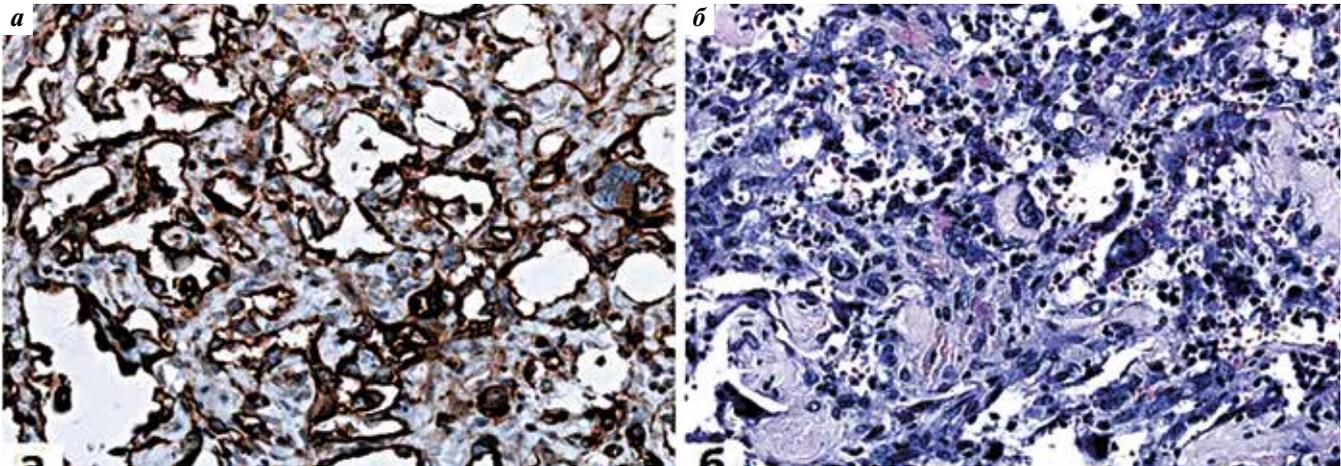


Рис. 5. Гемангиосаркома почечной капсулы мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином: положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 ($\times 400$): а – хорошо видны полости, которые, как правило, заполнены эритроцитами; б – хорошо виден клеточный полиморфизм (окраска гематоксилином и эозином)

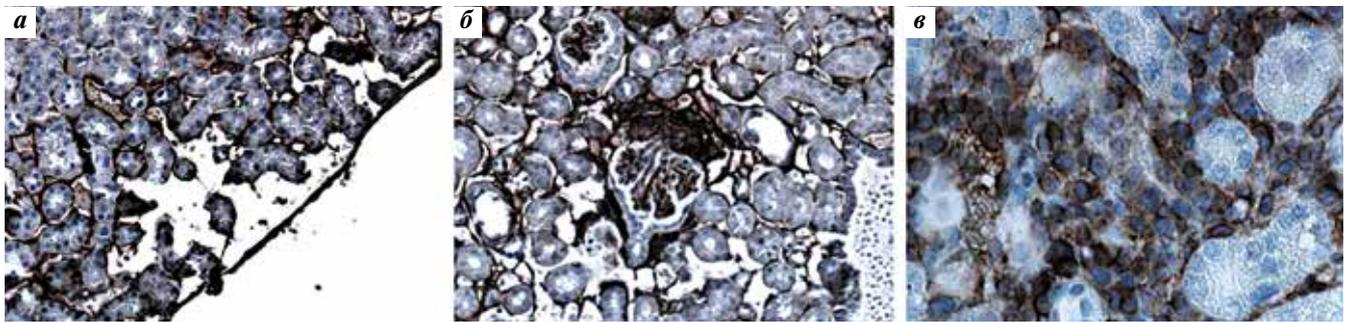


Рис. 6. Проплиферация эндотелия в почке мыши после воздействия 1,2-диметилгидразином ($\times 1000$): а – в субкапсулярной зоне; б – в около клубочковой области; в – в интерстиции в кортикальном слое

на активную пролиферацию эндотелия интерстиция (рис. бб, в).

Обсуждение

Несмотря на полученные данные о том, что индуцированные ГАС ПК могут развиваться из отдельных клеток эндотелия и капиллярных структур, обнаруженных в нашем исследовании, нельзя исключить путь происхождения индуцированных ДМГ сосудистых опухолей в ПК из полипотентных мезенхимальных клеток. Можно также предположить, что 3-м источником возникновения этих опухолей может быть интерстиций, в котором мы выявили активную пролиферацию эндотелия.

Возможно, развитие неопластического васкулогенеза *de novo* и васкулогенеза в эмбриогенезе может иметь общие механизмы. Известно, что *VEGFA* – основной регулятор ангиогенеза. У мышей самым ранним маркером предшественников ангиобластов является *VEGFAR2 (flk1)*, в отсутствие которого эмбрионы погибают [9]. Связывание *VEGFA* с *VEGFAR2 (flk1)* запускает каскад сигнальных путей, что приводит к развитию новых сосудов, стимулирует их рост, выживание и пролиферацию и влияет на дифференцировку [8, 10, 11]. Существует ряд факторов, которые

играют роль в формировании и дифференцировке зрелых сосудов (ангиопоэтин 1, ангиопоэтин 2, bFGF, TGF β и др.), а также могут усиливать активность *VEGFA* (например, фактор, индуцированный гипоксией 1 (HIF-1)) и, соответственно, влиять на неопластический васкулогенез. Известно, что Forkhead box D1 (Foxd1) играет существенную роль в эмбриональном васкулогенезе и развитии почки, в том числе ПК [12]. Кроме того, Foxd1-положительные мезенхимальные клетки развивающейся почки могут быть источником эндотелиальных предшественников, которые, вероятно, имеют решающее значение для формирования паттернов сосудистой сети [13]. Поскольку вопрос о существовании стволовых полипотентных клеток в ПК остается открытым, в дальнейших исследованиях для понимания механизмов образования сосудистых опухолей следует обратить внимание на изучение Foxd1-положительных клеток, а также экспрессию *VEGFA*, его рецепторов и других ангиогенных факторов.

Заключение

Таким образом, нам удалось обнаружить в интактной фиброзной капсуле у самцов мышей линии СВА возможный альтернативный источник индуцированного ДМГ неопластического ангиогенеза – CD34-положительные

предшественники эндотелия и капилляры, в противоположность традиционным представлениям о происхождении клеток опухолевого эндотелия *de novo* путем дифференцировки из мезенхимальных полипотентных клеток. В процессе морфогенеза ГАС ПК, по-видимому, происходят фазовые изменения экспрессии антигена CD34,

закрывающиеся в частичном или полном отсутствии ее на начальных стадиях развития опухоли. Кроме того, мы показали, что мишенью канцерогена может стать не только капсула, но и эндотелий интерстиция кортикального слоя почки и субкапсулярная зона. Ранее этот эффект ДМГ не был описан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чемерис Г.Ю. Влияние половых гормонов на индукцию ангиосарком почечной капсулы у мышей. Экспериментальная онкология 1989;11(2):71–2. [Chemeris G.Yu. Effect of sex hormones on the induction of renal capsule angiosarcoma in mice. Eksperimental'naya onkologiya = Experimental Oncology 1989;11(2):71–2. (In Russ.)].
2. Turusov V.S., Chemeris G.Y., Parfenov Y.D. Pararenal angiosarcoma induced in male mice by 1,2-dimethylhydrazine – a model for studying the role of androgens in chemical carcinogenesis. Carcinogenesis 1985;6(3):325–31.
3. Турусов В.С., Ланко Н.С. Параренальная ангиосаркома как проявление полового диморфизма в канцерогенезе. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1979;(7):74–5. [Turusov V.S., Lanko N.S. Pararenal angiosarcoma as a manifestation of sexual dimorphism in carcinogenesis. Bulletin' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1979;(7):74–5. (In Russ.)].
4. Пожариский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф., Чемерис Г.Ю. Морфология экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы. Вопросы онкологии 1990;36(3):321–7. [Pozhariskiy K.M., Kyshtoobaeva A.Sh., Klimashevskiy V.F., Chemeris G.Yu. Morphology of experimental malignant hemangi-
5. Billingsley E.D., Restrepo S. Kidney Sarcomas. In book: Medical radiology diagnostic imaging and radiation oncology. Eds.: A.L. Baert, Leuven K. Sartor, Heidelberg. Imaging of kidney cancer (Ed. Ali Guermazi). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. Pp. 145–159.
6. Пожариский К.М., Кыштообаева А.Ш., Климашевский В.Ф. и др. Морфогенез и гистогенез экспериментальной злокачественной гемангиоэндотелиомы. Вопросы онкологии 1990;36(4):440–8. [Pozhariskiy K.M., Kyshtoobaeva A.Sh., Klimashevskiy V.F. et al. Morphogenesis and histogenesis of experimental malignant hemangi endothelioma. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 1990;36(3):321–7. (In Russ.)].
7. Морозова О.В., Карамышева А.Ф., Шавочкина Д.А. Экспрессия *VEGFA* в процессе индукции 1,2-диметилгидразином злокачественной гемангиоэндотелиомы почечной капсулы у мышей. Вопросы онкологии 2013;(6):766–70. [Morozova O.V., Karamysheva A.F., Shavochkina D.A. Expression of *VEGFA* during 1,2-dimethylhydrazine induction of malignant hemangi endothelioma of renal capsule in mice. Voprosy onkologii = Problems in Oncology 2013;(6):766–70. (In Russ.)].
8. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процессах. Глава 10. В кн.: Введение в молекулярную медицину. Под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2004. С. 469. [Molecular mechanisms of angiogenesis in physiological and pathological processes. Chapter 10. In book: Introduction to molecular medicine. Ed. M.A. Pal'tsev. Moscow: Meditsina, 2004. P. 469. (In Russ.)].
9. Coultas L., Chawengsaksophak K., Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. Nature 2005;1438(7070):937–45.
10. Спринджук М.В. Ангиогенез. Морфология 2010;4(2):4–13. [Sprindzhuk M.V. Angiogenesis. Morfologiya = Morphology 2010;4(2):4–13. (In Russ.)].
11. Robert B., St John P.L., Hyink D.P., Abrahamson D.R. Evidence that embryonic kidney cells expressing flk1 are intrinsic, vasculogenic angioblasts. Am J Physiol 1996;271(3 Pt 2):744–53.
12. Levinson R.S., Batourina E., Choi C. et al. Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. Development 2014;141:17–27.
13. Sims-Lucas S., Schaefer C., Bushnell D. et al. Endothelial progenitors exist within the kidney and lung mesenchyme. PLoS One 2013;8(6):e65993.

Статья поступила: 27.10.2017. **Принята в печать:** 09.11.2017.

Article received: 27.10.2017. **Accepted for publication:** 09.11.2017.

Функциональный потенциал клеток памяти CD8⁺ в условиях лимфопении, вызванной введением гидрокортизона

Д. Б. Казанский, М. С. Вагида, Ю. Ю. Силаева, А. А. Калинина, М. А. Замкова, Л. М. Хромых,
Н. А. Персиянцева, Л. Х. Джолохава

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Дмитрий Борисович Казанский kazansky1@yandex.ru

Введение. Широкое применение глюкокортикоидов в терапии онкологических, аутоиммунных и аллергических заболеваний сопряжено с подавлением функций адаптивного иммунитета и ставит задачу углубленного исследования их иммунорегуляторных свойств и иммунотоксичности.

Результаты. Используя разработанную нами модель селективной активации мышиных клеток памяти CD8⁺ в смешанной культуре лимфоцитов (*mixed lymphocyte reaction, MLR*) *in vitro*, в этой работе мы впервые показали, что внутрибрюшинное введение мышам гидрокортизона в высокой дозе (2,5 мг на 1 животное) позволяет обнаружить Т-клетки памяти в тимусе животных, иммунизированных клетками аллогенной опухоли. Как и клетки памяти из других лимфоидных органов, лимфоциты тимуса иммунных животных, резистентные к гидрокортизону, отвечают пролиферацией на аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку и иммунологически специфичны к иммунизирующему аллоантигену. Таким образом, кортизонрезистентные тимоциты частично или полностью представлены клетками памяти. Также мы показали, что у гетерозигот по нокауту α -цепи TCR (генетически неспособных ко вторичной реарранжировке α -цепей) ответы клеток памяти значительно усилены по сравнению с ответами клеток памяти мышей дикого типа.

Заключение. Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу, согласно которой клоны Т-клеток памяти, размножившиеся в первичном иммунном ответе, мигрируют в тимус, обеспечивая микроокружение, необходимое для реэкспрессии ими рекомбиназ. После завершения редактирования α -цепей TCR такие Т-лимфоциты могут вернуться в периферический репертуар, подерживая его широту.

Ключевые слова: аллоантиген, противоопухолевый иммунитет, глюкокортикоид, Т-клеточный рецептор, иммунологическая память

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-42-49

Functional capacity of memory cells CD8⁺ under lymphopenia induced by injection of hydrocortisone

D. B. Kazansky, M. S. Vagida, Yu. Yu. Silaeva, A. A. Kalinina, M. A. Zamkova, L. M. Khromykh, N. A. Persiyantseva, L. Kh. Jolokhava

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Wide use of glucocorticoids therapy for neoplasms, autoimmune diseases and allergies is associated with suppression of adaptive immunity that requires profound study of their immunoregulatory properties and immunotoxicity.

Results. In this work, using our model of selective activation of mouse CD8⁺ memory cells in the mixed lymphocyte reaction (MLR) *in vitro*, we show for the first time that intraperitoneal injection of high dose hydrocortisone (2.5 mg per animal) allows to detect memory cells in the thymus of animals immunized with allogeneic tumor cells. Similar to memory cells from other lymphoid organs, hydrocortisone-resistant thymic lymphocytes from immune animals respond on allogeneic stimulators subjected to severe heat shock and are immunologically specific to immunizing alloantigen. Thus, cortisone-resistant thymocytes are partially or completely represented by memory cells. We also show here that memory responses of heterozygotes on TCR α -chain knock-out (genetically incapable to secondary rearrangement of TCR α -chains) are significantly enhanced as compared with the ones of wild type mice.

Conclusion. These findings allows to suggest the hypothesis according to which memory T cell clones proliferating in primary immune response migrate into thymus providing necessary microenvironment for reexpression of recombinaes. After editing of genes encoding TCR α -chains, such T lymphocytes can return to peripheral repertoire maintaining its wideness.

Key words: alloantigen, anti-tumor immunity, glucocorticoid, T cell receptor, immunological memory

Введение

В течение ряда лет мы занимаемся разработкой и приложениями простого варианта тестирования активности Т-клеток памяти CD8⁺, специфичных к аллогенным молекулам МНС класса I опухолевых клеток. Метод основан на измерении их пролиферации в ответе на мононуклеары селезенки и клетки аллогенных

опухолей *in vitro*, подвергнутые острому (45 °С, 1 ч) тепловому шоку [1]. В этих условиях первичный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов неиммунизированных животных в культуре *in vitro* не развивается, хотя Т-клетки памяти CD8⁺, индуцированные предварительной иммунизацией *in vivo*, способны к пролиферативному ответу на прогретые аллогенные

стимуляторы, несущие иммунизирующий аллоантиген. Такой ответ клеток памяти иммунологически специфичен и может быть воспроизведен на различных линиях мышей и опухолевых клеток, включая их комбинации, различающиеся лишь по одному белку главного комплекса гистосовместимости [2].

С помощью линий мышей, нокаутированных по генам, кодирующим белки TAP и β_2 -микроглобулин, мы показали, что в этой экспериментальной системе Т-клеточные рецепторы (T cell receptor, TCR) клеток памяти прямо распознают аллогенные молекулы МНС класса I прогретых клеток [3]. Используя смеси отвечающих лимфоцитов мышей дикого типа и лимфоцитов животных, экспрессирующих трансген зеленого флуоресцентного белка (GFP), мы показали, что в ответе на прогретые стимуляторы избирательно пролиферируют клетки памяти, индуцированные в первичном иммунном ответе на опухолевые клетки *in vivo*, но не наивные Т-лимфоциты (не встречавшие ранее данный антиген) [4]. Используя избирательность активации клеток памяти в таком ответе, мы получили их клоны и гибридомы, что открыло пути молекулярного клонирования цепей их TCR [5], а также создания трансгенных линий животных [6].

Результаты исследования особенностей иммунного статуса, Т-клеточного репертуара и иммунных ответов полученных нами трансгенных линий животных с трансгенной экспрессией α - и β -цепей Т-клеток памяти [7–9] позволили нам провести исследования функционального потенциала Т-клеток памяти в условиях экспериментальной лимфопении, вызванной введением гидрокортизона.

Актуальность данной работы диктуется широким применением глюкокортикоидов и их аналогов в терапии онкологических, аутоиммунных и аллергических заболеваний, а также тем, что нарушения функций клеток памяти, как правило, вовлечены в развитие этих патологических процессов, а Т-лимфоциты с их метаболическими свойствами рассматриваются как действенное средство иммунотерапии онкологических заболеваний [10, 11].

Материалы и методы

Животные. В работе были использованы линии мышей C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$), C57BL/10 ($K^bI-A^bD^b$), B10.D2 (R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^d$), B10.D2 ($K^dI-A^dI-E^dD^d$) и FVB ($K^qI-A^qI-E^qD^q$) разведения вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Гетерозиготы по нокауту α -цепи TCR – B6.129S2-*Tcr α ^{tm1Mom}*/J (H-2^b) – на генетической основе C57BL/6 исходно были получены из Jackson Laboratory. Далее их поддерживали и генотипировали в нашей лаборатории в соответствии с рекомендациями производителя [https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:26621,002116].

Клеточные линии. Клетки мастоцитомы P815 (H-2^d) культивировали *in vitro* в ростовой среде RPMI 1640

с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола, 2мМ L-глутамина и антибиотика ципрофлоксацина (KRKA, Словения) при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажностью. В эксперименте использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста. Клетки лимфомы EL-4 (H-2^b) получали в асцитной форме, трансплантируя их в количестве $(3-5) \times 10^6$ мышам сингенной линии C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$). Через 10–14 сут собирали асцит, трижды отмывали центрифугированием (200 g, 5 мин) в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) и использовали для иммунизации мышей.

Приготовление клеточных суспензий. Мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали селезенку, тимус и мезентериальные лимфатические узлы. Селезенку помещали в гомогенизатор Поттера с 3 мл питательной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). После гомогенизации органа полученную суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин при температуре 4 °С. Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали и проводили гипотонический лизис эритроцитов. Для этого к осадку спленоцитов добавляли 360 мкл стерильной дистиллированной воды, пробирку встряхивали в течение 10–20 с и добавляли 40 мкл 10-кратного фосфатно-солевого буфера и 6–7 мл 1-кратного фосфатно-солевого буфера. Затем клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 мин при температуре 4 °С, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в 3 мл питательной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Тимус и лимфатические узлы гомогенизировали описанным выше образом, осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 мин при температуре 4 °С и осадок клеток ресуспендировали в 3 мл питательной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Затем подсчитывали количество клеток в полученной суспензии в камере Горяева в присутствии смеси красителей трипанового синего и эозина.

Иммунизацию мышей проводили, вводя внутривентриально животным каждой линии 0,5 мл суспензии опухолевых клеток (концентрация 4×10^7 млн/мл). Контрольной группе мышей вводили внутривентриально 0,5 мл 1 × PBS (ПанЭко, Россия). Через 2 мес после иммунизации спленоциты этих мышей использовали в экспериментах как источник долгоживущих клеток памяти.

Реакция MLR (mixed lymphocyte reaction). В плоскодонные 96-луночные планшеты добавляли 2×10^6 спленоцитов мышей C57BL/6, обработанных митомицином С и ресуспендированных в полной среде. Через 2 ч инкубации при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажностью неприкрепившиеся клетки удаляли из лунок промывкой средой, подогретой до 37 °С. Полученные монослои адгезивных спленоцитов, содержащие дендритные клетки селезенки, использовали для дальнейшей постановки MLR.

Для постановки MLR 4×10^5 отвечающих мононуклеаров лимфатических узлов, селезенки и тимуса (репондеров) инкубировали в присутствии аллогенных или сингенных стимулирующих спленоцитов (стимуляторов), обработанных митомицином С (Киова Хакко Когио Ко., Лтд., Япония) (25 мкг/мл, 37 °С, 30 мин), в количестве 4×10^5 клеток на лунку 96-луночного планшета. Для избирательной активации клеток памяти стимуляторы подвергали острому тепловому шоку (инкубация спленоцитов при температуре 45 °С в течение 60 мин), затем их добавляли в культуру в количестве 4×10^5 на лунку. Клетки инкубировали в полной ростовой среде: RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 5 % сыворотки человека, 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения), 4 ммоль L-глутамин (Sigma), 20 ммоль HEPES (ПанЭко, Россия) и 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола (Merck) при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажностью в течение 72 ч. Пролиферацию клеток оценивали по включению ³H-тимидина в течение последних 8 ч культивирования.

Антитела. Для анализа и обнаружения опухолевых клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) использовали анти-D^d-антитела (клон 34-2-12) для выявления клеток мастоцитомы P815 и анти-K^b (клон Y-3) (BD Bioscience, США) для обнаружения клеток лимфомы EL4. Для окрашивания мертвых клеток использовали пропидия йодид (PI) $7,5 \times 10^{-5}$ М (Sigma, США) или 7AAD Viability Staining Solution в соответствии с рекомендациями производителя (BioLegend, США).

Окрашивание антителами и анализ на проточном цитофлуориметре. Окрашивание антителами выполняли при температуре 4 °С в течение 30–50 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программы BD FACSDiva 6.0. Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию PI (в ряде экспериментов – 7AAD) и по показателям рассеивания. Анализировали не менее 100 тыс. событий для характеристики периферических популяций Т-лимфоцитов. Для анализа результатов использовали программу Flow Jo 7.6.

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в 3 повторах. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для оценки достоверности различий применяли *t*-критерий Стьюдента. Значение $p \leq 0,05$ считали статистически достоверным.

Результаты

Способность гидрокортизона в высоких дозах вызывать глубокую лимфопению давно и хорошо известна [12]. Как нами было показано ранее, введение гидрокортизона мышам приводило к глубокому (на 95–98 %) снижению клеточности тимуса и умеренному (на 25–30 %) снижению клеточности селезенки и лимфатических узлов на 2-е сутки после введения. Состав

основных субпопуляций тимуса претерпевал существенные изменения, которые выражались в значительном (с 95 до 5 %) снижении доли незрелых клеток CD4⁺CD8⁺ и увеличении долей клеток CD4⁺CD8⁻ (с 8–10 до 70 %) и CD4⁻CD8⁺ (с 3–5 до 18 %) [13].

Иммунизация мышей C57BL/10 клетками мастоцитомы P815 и мышей B10. D2 (R101) клетками лимфомы EL4 проводилась с последующей детекцией опухолевых клеток в лимфоидных органах реципиентов методом проточной цитофлуориметрии с антителами к молекулам D^d и K^b соответственно. Такой подход позволял выявить лишь минорное присутствие опухолевых клеток в периферических лимфоидных органах реципиентов на 3–6-е сутки после иммунизации. В тимусе реципиентов не обнаруживалось даже единичных опухолевых клеток (данные не представлены).

В присутствии спленоцитов, способных к адгезии к пластику (субпопуляция, обогащенная дендритными клетками миелоидного происхождения), клетки памяти пролиферируют в ответ на специфические аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку. Поскольку различные лимфоидные органы различаются в процентном содержании клеток этого типа, для выявления клеток памяти в различных лимфоидных органах мы использовали вариант MLR, в котором перед постановкой реакции на дно лунки помещали 2×10^6 мышинных спленоцитов, обработанных митомицином С, сингенных отвечающим клеткам. Через 2 ч инкубации в CO₂-инкубаторе неприкрепившиеся клетки отмывали средой, подогретой до температуры 37 °С, и саму реакцию MLR ставили на подложке из прикрепившихся клеток. В качестве респондеров применяли мононуклеары мезентериальных лимфатических узлов, селезенки и тимуса мышей C57BL/10 (H-2^b), интактных и предварительно иммунизированных 2×10^7 клеток мастоцитомы P815 (H-2^d). Части мышей каждой группы за 2 сут до постановки реакции вводили гидрокортизон в дозе 2,5 мг на 1 животное. В качестве стимуляторов использовали спленоциты мышей линий C57BL/10 (H-2^b – сингенные), B10. D2 (R101) (K^dI^dD^b – аллогенные) и FVB (H-2^a – посторонние), обработанные митомицином С или прогреванием (45 °С, 1 ч). На рис. 1 и 2 представлены результаты, показывающие, что в лимфатических узлах иммунизированных животных присутствуют клетки памяти, специфически отвечающие на прогретые стимуляторы мышей R101, несущие на своей поверхности молекулу H-2^d, общую с иммунизирующими клетками мастоцитомы P815, и что введение гидрокортизона в высокой дозе приводит к неспецифическому усилению пролиферации в культурах, которое может быть отнесено к регенерации органа. Как и следовало ожидать, у интактных неиммунизированных животных пролиферация в ответ на аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку, находится на уровне фоновой пролиферации в ответ на сингенные клетки.

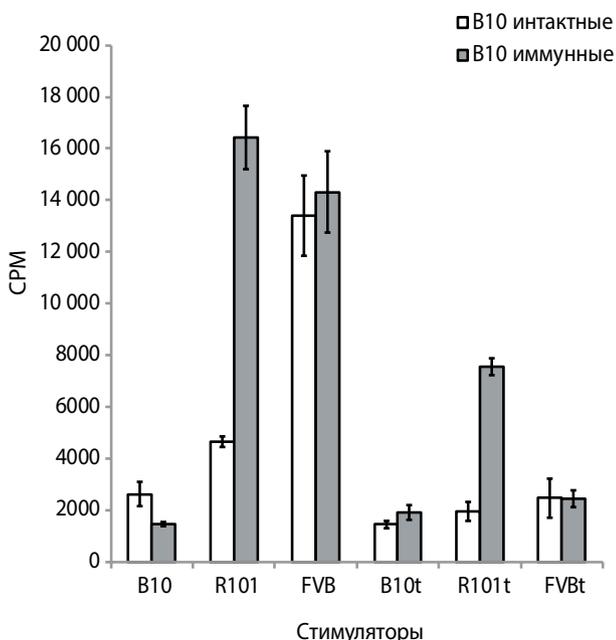


Рис. 1. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти лимфатических узлов мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали клетки лимфатических узлов (LN) мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815. Здесь и на рис. 2–7: в качестве стимуляторов – спленциты мышей C57BL/10 (H-2^b), B10. D2 (R101) (K^dI^d) и FVB (H-2^b), обработанные митомицином C или прогреванием (45 °C, 1 ч) – (t). CPM (counts per minute) – количество импульсов/мин на 4×10^5 клеток

Аналогично в селезенке интактных животных (рис. 3) отсутствует пролиферация в ответ на аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку. У иммунизированных животных выявляется интенсивный антигенспецифический ответ на прогретые стимуляторы мышей R101. Введение гидрокортизона интактным и иммунизированным животным приводит к неспецифическому снижению пролиферативного ответа с прекращением ответа клеток памяти селезенки (рис. 4).

Неожиданным оказалось то, что клетки памяти обнаруживаются в тимусе (рис. 5, 6) и введение гидрокортизона позволяет увидеть их ответ многократно усиленным, вероятно, за счет обогащения клетками, устойчивыми к действию гидрокортизона. Из этих экспериментов следуют 3 важных вывода. Во-первых, лимфопения, вызванная введением гидрокортизона, не «превращает» наивные клетки в клетки памяти, так как они не начинают пролиферировать в ответ на прогретые аллогенные стимуляторы. Кажущаяся повышенной интенсивность ответа лимфоцитов неиммунизированных животных с лимфопенией на прогретые аллогенные стимуляторы увеличивается пропорционально ответу на сингенные стимуляторы и почти не отличается от них. Во-вторых, обнаружено новое, ранее неизученное свойство клеток памяти – способность

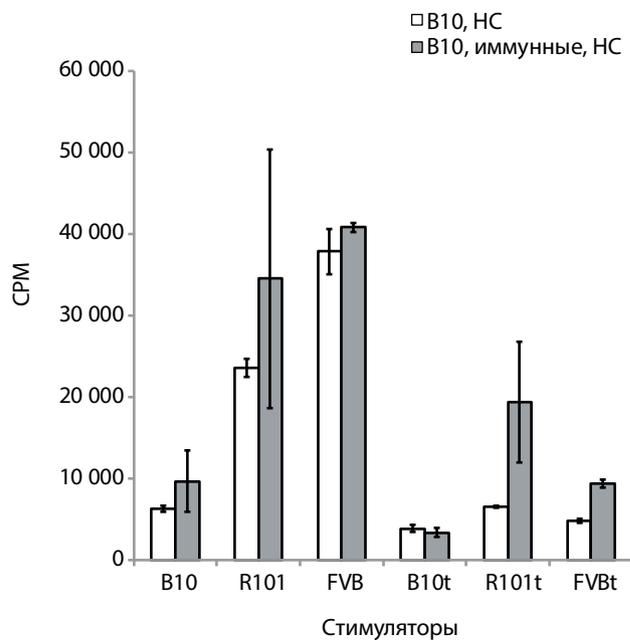


Рис. 2. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти лимфатических узлов мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали клетки лимфатических узлов (LN) мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815, с введением гидрокортизона (HC) за 2 сут до постановки эксперимента

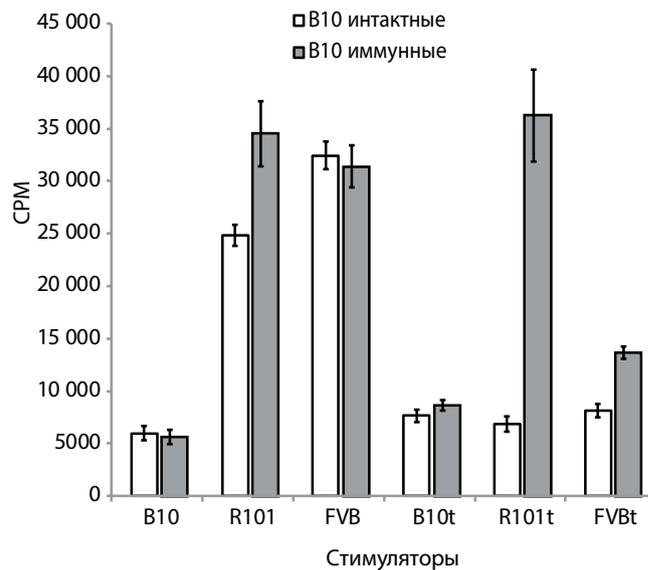


Рис. 3. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти селезенки мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали мононуклеары селезенки мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815

к реиммиграции в тимус. В-третьих, мы впервые получили прямое указание на то, что кортизонрезистентные тимоциты, известные в течение многих лет, могут быть частично или полностью представлены клетками памяти.

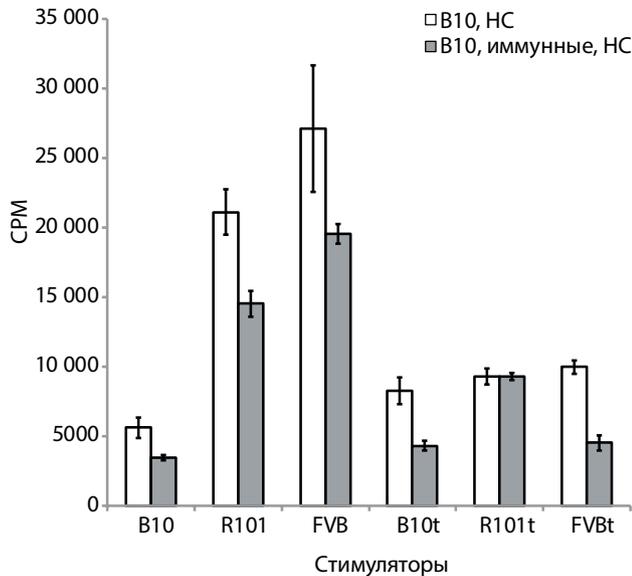


Рис. 4. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти селезенки и мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали мононуклеары селезенки мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815, с введением гидрокортизона (HC) за 2 сут до постановки эксперимента

Нами также был получен результат, который может объяснить смысл появления в тимусе клеток памяти. У мышей – гетерозигот по нокауту α -цепи TCR – B6.129S2-*Tcr α ^{tm1Mom}/J* (H-2^b) – на генетической основе C57BL/6 с ограниченной способностью к реаранжировкам генов α -цепей TCR вторичные иммунные ответы оказались существенно повышенными (рис. 7), что свидетельствует о связи гомеостаза клеток памяти с гипотетическим процессом редактирования TCR в зрелых периферических Т-лимфоцитах. При этом первичные ответы Т-лимфоцитов неиммунизированных мышей дикого типа и гетерозигот вполне сопоставимы по величине.

Обсуждение

В этой работе нами получен новый и неожиданный результат – устранение незрелых клеток тимуса введением высокой дозы гидрокортизона позволило обнаружить в кортизонрезистентной фракции тимоцитов клетки памяти, специфичные к аллоантигенам иммунизирующих клеток. Интенсивность их ответа на иммунизирующий аллоантиген, представленный на клетках-стимуляторах, подвергнутых острому тепловому шоку, вполне сопоставима с интенсивностью ответа клеток памяти, локализованных в периферических лимфоидных органах. Традиционно тимус рассматривается как лимфоидный орган, способный только к экспорту лимфоидных клеток, но не к проникновению в него периферических Т-лимфоцитов, за исключением редких случаев тимусов мышей с врожденной лимфопенией [14]. Это убеждение противоречит результатам работ С.С. King и соавт., показавших, что вертикальное

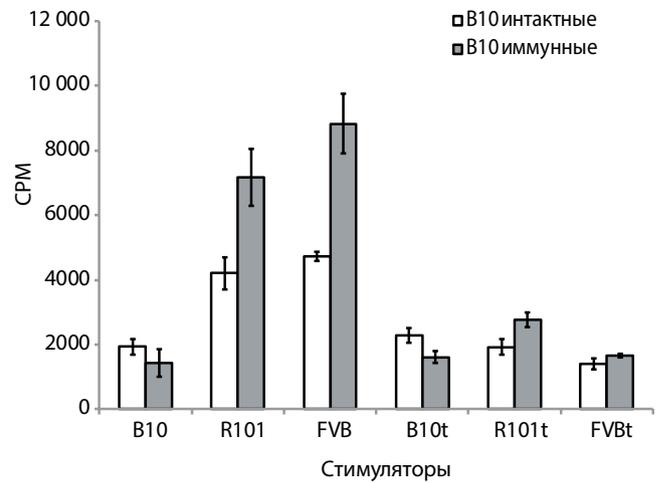


Рис. 5. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти тимуса мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали тимоциты мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815

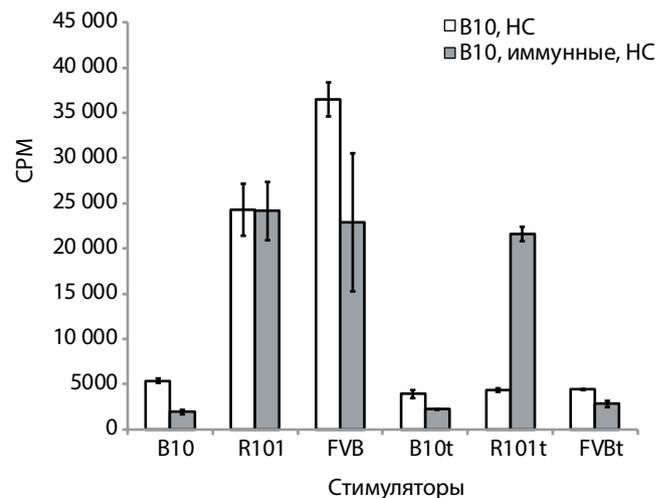


Рис. 6. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти тимуса мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали тимоциты мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815, с введением гидрокортизона (HC) за 2 сут до постановки эксперимента

инфицирование вирусом лимфоцитарного хориоменингита ведет к носительству вируса клетками тимуса и неспособности реципиента развить иммунный ответ на него [15]. Введением CTL из внешнего источника удалось снизить толерантность иммунной системы носителя к вирусу и добиться полной очистки организма от вирусных продуктов, в том числе их удаления из кортикальной и медуллярной зон тимуса [15]. Однако надо иметь в виду, что в этом случае речь идет об активном иммунном ответе и миграции эффекторных клеток в очаги локализации антигена. Очевидно, что в нашем случае это не так, поскольку нам никогда не удалось обнаружить сколько-нибудь значимого

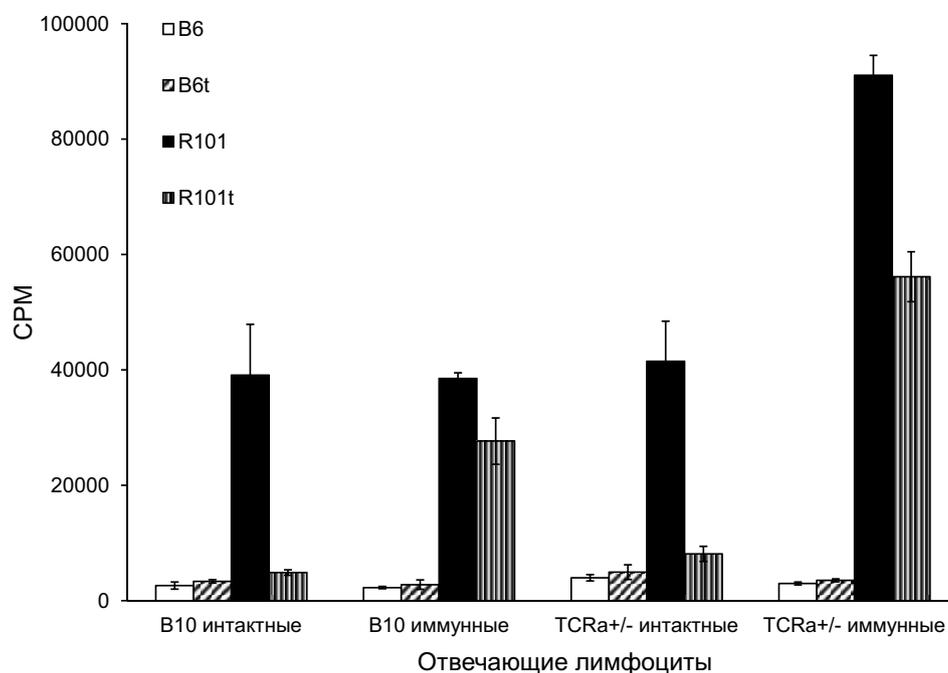


Рис. 7. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти мышей C57BL/10 и гетерозигот по нокауту α -цепи TCR – B6.129S2-Tcratm1Mom/J (H-2^b) в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ³H-тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали спленоциты мышей C57BL/10 и гетерозигот по нокауту α -цепи TCR, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815

присутствия введенных аллогенных опухолевых клеток в тимусе реципиента. Таким образом, наблюдаемый нами феномен имеет в своей основе более специфические особенности биологии клеток памяти, чем их миграция в сайт локализации антигена.

Пролить свет на эту загадку позволяет наш результат исследования ответов клеток памяти у животных с генетически ограниченной способностью к реаранжировкам α -цепей TCR. У генетических нокаут по α -цепи TCR формирование ее функционального гена невозможно. У гетерозигот по этому нокауту функциональная α -цепь TCR может сформироваться лишь в случае успешно прошедшей реаранжировки гена на 2-й хромосоме, тогда как 1-я несет нулевой аллель. Физиологически это будет соответствовать ситуации ограничения числа возможных реаранжировок, которым могут подвергнуться гены α -цепей в ходе формирования T-клеточного репертуара в тимусе. Именно в этом органе создается микроокружение, необходимое для экспрессии рекомбиназ RAG-1 и RAG-2, осуществляющих такую реаранжировку [16]. Мы обнаружили, что первичные иммунные ответы на аллоантиген у мышей дикого типа и у гетерозигот сопоставимы по величине, тогда как вторичные ответы у гетерозигот по нокауту резко усилены. Это может означать, что у гетерозигот нарушены гомеостатические механизмы регуляции размеров пула, которые занимают в репертуаре клетки памяти, а сами эти механизмы прямо связаны с возможностью повторной реаранжировки генов α -цепей TCR. Очевидно, что такой механизм должен заключаться в редактировании генов α -цепей, нацеленном

на устранение избыточного количества T-клеток памяти, возникших в ходе первичного иммунного ответа. Существование такого механизма позволило бы организму сохранять широту репертуара T-клеток для успешного иммунного ответа на другие антигены и могло бы дать рациональное объяснение появлению в тимусе клеток памяти. Такое объяснение вполне возможно ввиду накапливающихся данных о ревизии зрелого периферического репертуара T-лимфоцитов [17].

Заключение

В этой статье мы впервые показали, что лимфопения, вызванная введением мышам высокой (2,5 мг на животное) дозы гидрокортизона, позволяет обнаружить аллоспецифические клетки памяти в тимусе животных, иммунизированных клетками аллогенных опухолей. Мы продемонстрировали также, что у гетерозигот по нокауту α -цепи TCR ответы клеток памяти значительно усилены по сравнению с клетками памяти мышей дикого типа. Этот феномен указывает на существование в нормальном организме механизма утилизации клеток памяти, связанного со вторичной реаранжировкой (редактированием) их α -цепей TCR, протекание которой невозможно у гетерозигот по нокауту α -цепи. Поскольку тимус обеспечивает T-лимфоцитам микроокружение, необходимое для экспрессии рекомбиназ RAG-1 и RAG-2, мы высказываем гипотезу о том, что присутствие в тимусе клеток памяти связано с редактированием их TCR и, таким образом, возможностью их последующей реутилизации в иммунных ответах на другие антигены.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01897).

Financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 14-04-01897).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Казанский Д.Б., Петришев В.Н., Штиль А.А. и др. Использование теплового шока антигенпрезентирующих клеток для функционального тестирования аллоспецифических Т-клеток памяти. *Биоорганическая химия* 1999;25(2):117–28. [Kazanskiy D.B., Petrishchev V.N., Shtil' A. A. et al. Use of heat shock of antigen-presenting cells for functional testing of allospecificity memory T-cells. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry* 1999;25(2):117–28. (In Russ.)].
2. Казанский Д.Б., Чернышева А.Д., Сернова Н.В. и др. Природа эпитопов, распознаваемых Т-лимфоцитами в аллогенном иммунном ответе. *Молекулярная биология* 1998;32(4):692–702. [Kazanskiy D.B., Chernysheva A.D., Sernova N.V. et al. The nature of epitopes, recognized by T-lymphocytes in the allogenic immune response. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 1998;32(4):692–702. (In Russ.)].
3. Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю. и др. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клона клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2004;137(5):493–8. [Pobezinskaya E.L., Pobezinskii L.A., Silaeva Y.Y. et al. Cross reactivity of T cell receptor on memory CD8⁺ cells isolated after immunization with allogeneic tumor cells. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2004;137(5):493–8. (In Russ.)].
4. Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А. и др. Подавление клетками памяти CD8⁺ первичного аллогенного ответа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2005;140(5):545–9. [Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L., Pobezinskii L.A. et al. Suppression of primary allogenic response by CD8⁺ memory cells. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005;140(5):545–9. (In Russ.)].
5. Звездова Е.С., Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л. и др. Корецепторная функция CD4 в ответе на молекулу МНС класса I. *Молекулярная биология* 2008;42(4):662–72. [Zvezdova E.S., Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L. et al. Coreceptor function of CD4 in response to MHC class I molecule. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2008;42(4):662–72. (In Russ.)].
6. Звездова Е.С., Силаева Ю.Ю., Вагида М.С. и др. Создание трансгенных животных, экспрессирующих α- и β-цепи аутореактивного TCR. *Молекулярная биология* 2010;44(2):311–22. [Zvezdova E.S., Silaeva Yu.Yu., Vagida M.S. et al. Generation of transgenic animals, expressing alpha and beta-chains of autoreactive TCR. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2010;44(2):311–22. (In Russ.)].
7. Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С. и др. Сокращение пула Т-лимфоцитов с поверхностным фенотипом эффекторов и клеток памяти под воздействием экспрессии трансгена β-цепи Т-клеточного рецептора. *Биохимия* 2013;78(5):714–26. [Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A., Vagida M.S. et al. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β-chain expression. *Biokhimiya = Biochemistry* 2013;78(5):714–26. (In Russ.)].
8. Силаева Ю.Ю., Гриненко Т.С., Вагида М.С. и др. Immune selection of tumor cells in TCR β-chain transgenic mice. *J Immunotoxicol* 2014;1(4):393–9.
9. Казанский Д.Б., Силаева Ю.Ю., Калинина А.А. и др. Трансплантационный и специфический противоопухолевый иммунитет в ретроспективе: новые модели, основанные на трансгенезе цепей Т-клеточного рецептора. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(1):14–27. [Kazanskiy D.B., Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A. Transplantation and specific antitumor immunity in retrospective view: new models based on transgenesis of individual chains of T-cell receptor. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(1):14–27. (In Russ.)].
10. Sukumar M., Kishon R.J., Restifo N.P. Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2017;46:14–22.
11. Казанский Д.Б., Силаева Ю.Ю., Калинина А.А. и др. Метаболические аспекты адоптивной иммунотерапии опухолей. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4(3):21–6. [Kazanskiy D.B., Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A. Metabolic aspects of adoptive immunotherapy of tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2017;4(3):21–6. (In Russ.)].
12. Craddock C.G. Corticosteroid-induced lymphopenia, immunosuppression, and body defense. *Ann Intern Med* 1978;88(4):564–6.
13. Anfalova T.V., Khromykh L.M., Petrishchev V.N. et al. Characteristics of the cells producing thymic chemotactic factor for bone marrow stem cells. *Ontogenez* 2002;33(2):90–4.
14. Sprent J., Surh C.D. Re-entry of mature T cells to the thymus: an epiphenomenon? *Immunol Cell Biol* 2009;87(1):46–9.
15. King C.C., Jamieson B.D., Reddy K. et al. Viral infection of the thymus. *J Virol* 1992;66(5):3155–60.
16. Yehuda A.B., Friedman G., Wirtheim E. et al. Checkpoints in thymocytopoiesis in aging: expression of the recombination activating genes RAG-1 and RAG-2. *Mech Ageing Dev* 1998;102(2–3):239–47.
17. Higdson L.E., Deets K.A., Friesen T.J. et al. Receptor revision in CD4 T cells is influenced by follicular helper T cell formation and germinal-center interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(15):5652–7.

Статья поступила: 30.10.2017. **Принята в печать:** 09.11.2017.

Article received: 30.10.2017. **Accepted for publication:** 09.11.2017.

Уважаемые коллеги!

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

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour> или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru.

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

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

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

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

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

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

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

4. Иллюстративный материал:

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

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

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

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

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

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

5. Единицы измерений даются в СИ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

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

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

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

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

