

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Метаболические аспекты
адоптивной иммунотерапии
опухолей*

*МикроРНК-155 в патогенезе
онкологических заболеваний*

*Трансформирующий фактор
роста бета-1 в онкогенезе
аденокарциномы легкого*

*Роль ингибирования аутофагии
в изменении цитотоксичности
темозоломида*

*Экзосомы и развитие
резистентности опухолевых
клеток к метформину*

ТОМ 4 № 3
2017



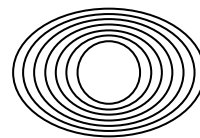
Журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

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>

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ь Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й Ж У Р Н А Л

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 лабораторией молекулярной эндокринологии (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «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 .

3 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

Статьи направлять по адресу:

adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор **Н.В. Жукова**

Корректор **В.А. Наумкина**

Дизайн **Е.В. Степанова**

Верстка **Е.А. Прокофьева**

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. № 3. 1–110

© 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 Наталья 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, руководитель отдела опухолевого роста 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)

Карпунин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБУ «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 Наталья 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 отделения прогноза Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Минздрава России – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии», заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

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

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии ФГБУ «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, 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)

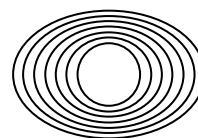
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

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 the Laboratory of Molecular Endocrinology (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zhorovskaya 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

3 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

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

Managing editor N.V. Zhukova
Proofreader V.A. Naumkina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up E.A. Prokofieva
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. 3. 1–110

© PH "ABV-Press", 2017

Pressa Rossii catalogue index:
93562

Printed at Mediacolor 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, Head of the Department of Tumor Growth of the 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, Chair in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)*

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

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

Tjulandin Sergey A., *MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Research Work of the Research Institute of Clinical Oncology of N.N. Blokhin 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, 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 Chair of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)*

Davydov Mikhail I., *MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director of the N.N. Blokhin 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)*

Kopnin 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)*

Академику Михаилу Ивановичу Давыдову – 70 лет

Михаил Иванович Давыдов – блистательный хирург-онколог с мировым именем, известный ученый, профессор, главный внештатный онколог Минздрава России, академик РАМН и РАН, главный онколог медицинского центра Управления делами Президента России, член Европейского и Американского обществ хирургов, Международного общества хирургов и Нью-Йоркской академии наук. По оценкам международных экспертов, он входит в пятерку лучших хирургов мира.

Михаил Иванович родился 11 октября 1947 г. в г. Конотопе Сумской области УССР и уже с детства отличался сильным характером и лидерскими качествами. Неудивительно, что его юность была связана со служением Родине. Еще школьником и во время службы в армии в воздушно-десантных войсках он профессионально занимался спортом и стал мастером спорта СССР международного класса по боксу. Сразу после окончания срочной службы Михаил Иванович твердо решил стать врачом и поступил в Первый Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова, а после его окончания – в ординатуру и аспирантуру Всесоюзного онкологического научного центра.

Вся жизнь академика М.И. Давыдова связана с Национальным медицинским исследовательским центром онкологии им. Н.Н. Блохина. Свою трудо-



Утверждение классика о том, что красота спасет мир, широко известно. Но то, что красота может ежедневно спасать вполне конкретные человеческие жизни, знают немногие. Это «красота» онкологических операций, которые каждый день выполняет академик Михаил Иванович Давыдов.

вую деятельность он начал в то время, когда директором Всесоюзного онкологического научного центра был академик Николай Николаевич Блохин, которого Михаил Иванович считает своим учителем. Это время творческой деятельности многих выдающихся исследователей и ученых нашей страны, новаторских изысканий в медицинской науке. Данная школа заложила основу для стремительного

и мощного развития, которое происходило с онкологической наукой с 2001 г. – в период, когда Центр возглавил М.И. Давыдов. Сегодня Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина является ведущей клиникой России и Европы, одной из самых крупных онкологических клиник в мире, активным участником и координатором деятельности медицинских онкологических организаций мира, Европы, России и стран СНГ.

Блестящая хирургическая техника – одно из самых знаменитых профессиональных качеств академика Давыдова – недаром его называют «Паганини хирургии». Михаил Иванович – создатель школы торако-абдоминальной хирургии, главный идеолог и разработчик многих крупных направлений в хирургическом и комбинированном лечении опухолей легких, трахеи, бронхов, средостения, пищевода, желудка, поджелудочной железы, почек. В стенах Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина проведены тысячи уникальных операций, некоторые из которых и по сей день не выполняются нигде в мире. Большая часть принципиально новых методик хирургии, отличающихся оригинальностью технического исполнения, безопасностью и высо-

кой физиологичностью, разработана и внедрена в практику лично М.И. Давыдовым и его учениками. Под его руководством разработаны и регулярно совершенствуются методы предоперационной подготовки и послеоперационного интенсивного ведения онкологических больных.

Он является вдохновителем и приоритетных направлений фундаментальных медицинских исследований в онкологии. Академик М.И. Давыдов – действующий Президент Ассоциации онкологов России, основная деятельность которой направлена на улучшение методов и качества профилактики, диагностики и лечения онкологических заболеваний в России и под эгидой которой происходят крупнейшие научные и организационные события в онкологии.

Михаил Иванович Давыдов является организатором широкой программы послевузовского образования в клинической и фундаментальной онкологии. Под его руководством защищены 57 докторских и 50 кандидатских диссертаций. Он – автор и соавтор более 900 научных работ, включая 34 монографии и 9 научно-методических фильмов, 20 изобретений и рационализаторских предложений.

В период своего руководства РАМН (2006–2011) Михаил Иванович являлся инициатором и автором проектов, направленных на решение не только принципиальных задач в российском здравоохранении, но и социально-эконо-

мических вопросов. На протяжении всей профессиональной деятельности он всегда отстаивает конституционное право граждан России на бесплатную, доступную, квалифицированную медицинскую помощь. Он придерживается четкой и продуманной позиции в отношении построения системы онкологической службы в стране и предпринимает активные шаги по реализации приоритетных национальных проектов в российском здравоохранении. Именно М.И. Давыдову принадлежит идея создания программы Национальной стратегии по борьбе с онкологическими заболеваниями, которая по заданию Правительства России активно разрабатывается и будет представлена в Минздраве России уже до конца 2017 г.

Многолетняя плодотворная научная, клиническая, организационная работа Михаила Ивановича, его огромный вклад в российскую медицинскую науку отмечены высокими наградами. Ему присвоено звание «Заслуженный деятель науки России», он является лауреатом Государственной премии в области науки и техники, премии им. Т.И. Ерошевского за лучшую работу в области медицинской геронтологии и гериатрии, премии «Триумф-наука» в области наук о жизни и медицины, премии Правительства России в области науки и техники, премии им. А.Н. Бакулева «За выдающиеся достижения в онкологии и новаторские работы в лечении интерактивной патологии», междуна-

родной премии «Профессия – жизнь» в номинации «За выдающийся вклад в развитие клинической медицины в области онкологии», российской премии Людвига Нобеля.

М.И. Давыдов награжден орденом «За заслуги перед отечеством» IV степени, орденом Почета, орденом «За заслуги перед Республикой Башкортостан», орденом Украины «За заслуги» III степени, орденом «За честь, доблесть, созидание, милосердие», орденом «Звезда экономики России», золотой медалью им. А.Н. Бакулева, золотой медалью академика Б.В. Петровского «Выдающемуся хирургу мира».

Академик М.И. Давыдов – выдающийся врач, высококвалифицированный хирург, новатор, широко образованный ученый и требовательный принципиальный организатор – пользуется непререкаемым авторитетом среди своих коллег, в медицинских кругах России и у мировых экспертов онкологии. Многолетний самоотверженный труд на благо онкологических пациентов, умение увлекать единомышленников личным примером, постоянная готовность оказать помощь снискали Михаилу Ивановичу огромное уважение коллег, сотрудников и учеников, безграничную любовь и благодарность больных.

Талантливые люди талантливы во всем. Михаил Иванович – тонкий ценитель музыки, великодушный рассказчик, знаток оружия и военной истории, знаменитый охотник, человек широкой и щедрой души.

Редакция журнала «Успехи молекулярной онкологии» поздравляет Михаила Ивановича с юбилеем и желает ему крепкого здоровья и профессиональных успехов!

ЮБИЛЕЙ	6
---------------------	----------

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>Л.Г. Соленова, М.Г. Якубовская</i> Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами	10
<i>Д.Б. Казанский, Ю.Ю. Силаева, А.А. Калинина, М.А. Замкова, Л.М. Хромых, Н.А. Персиянцева, Л.Х. Джолохава</i> Метаболические аспекты адоптивной иммунотерапии опухолей	21
<i>И.Б. Зборовская, А.В. Комельков</i> МикроРНК-155-5р в патогенезе онкологических заболеваний	27
<i>Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова</i> Роль эпигенетических факторов в патогенезе нейрофиброматоза 1-го типа	37
<i>А.А. Ставровская, Н.И. Моисеева, Г.П. Генс, Е.Ю. Рыбалкина</i> Секретируемый белок YB-1 и его прогностическая значимость	50
<i>Л.Н. Любченко, М.Г. Филиппова, Т.А. Шендрикова, Л.Г. Жукова, Н.И. Мехтиева, О.В. Крохина, С.М. Портной</i> Фармакогенетическое тестирование аллельных вариантов гена CYP2D6 при гормоноположительном раке молочной железы	57

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>В.Е. Шевченко, И.С. Брюховецкий, З.Н. Никифорова, С.В. Ковалев, И.А. Кудрявцев, Н.Е. Арноцкая</i> Трансформирующий фактор роста бета-1 в онкогенезе аденокарциномы легкого человека	67
<i>О.О. Рябая, А.Н. Иншаков, А.А. Мальшева, И.С. Абрамов, Н.В. Шолина, Д.А. Хоченков, Е.В. Степанова</i> Роль ингибирования аутофагии в изменении цитотоксичности темозоломида на клеточных линиях меланомы	75
<i>А.С. Макарова, О.М. Кривцова, М.С. Чесноков, Н.Л. Лазаревич</i> Влияние нарушенной экспрессии HNF4α на чувствительность клеток гепатоцеллюлярной карциномы к действию ингибиторов проопухолевых сигнальных каскадов	83
<i>С.Е. Семина, Е.А. Руденская, А.Г. Миттенберг, С.В. Шабельников, М.А. Красильников</i> Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование	92
<i>Л.А. Савлущинская, И.А. Бакулин, А.А. Молодык</i> Эритроцитарный диагностикум для выявления опухолевого процесса	99

<i>В.В. Делекторская</i> Нэйроэндокринные новообразования поджелудочной железы: новые аспекты морфологической классификации (Всемирная организация здравоохранения, 2017)	104
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

НЕКРОЛОГ	109
-----------------------	------------

JUBILEE	6
REVIEWS	
<i>L.G. Solenova, M.G. Yakubovskaya</i> Chemotherapy: some potential risks under antineoplastic drugs handling	10
<i>D.B. Kazanskiy, Yu. Yu. Silaeva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, L.M. Khromykh, N.A. Persiyantseva, L.Kh. Dzholokhava</i> Metabolic aspects of adoptive immunotherapy of tumors	21
<i>I.B. Zborovskaya, A.V. Komel'kov</i> MicroRNA-155-5p in pathogenesis of cancer	27
<i>R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova</i> The role of epigenetic factors in the pathogenesis of neurofibromatosis type 1	37
<i>A.A. Stavrovskaya, N.I. Moiseeva, G.P. Guens, E.Yu. Rybalkina</i> Secreted protein YB-1 and its prognostic significance	50
<i>L.N. Lyubchenko, M.G. Filippova, T.A. Shendrikova, L.G. Zhukova, N.I. Mekhtieva, O.V. Krokhnina, S.M. Portnoy</i> Pharmacogenetic testing of allelic variants of the <i>CYP2D6</i> gene in hormone positive breast cancer	57
EXPERIMENTAL REPORTS	
<i>V.E. Shevchenko, I.S. Bryukhovetskiy, Z.N. Nikiforova, S.V. Kovalev, I.A. Kudryavtsev, N.E. Arnotskaya</i> The transforming growth factor beta-1 in the oncogenesis of human lung adenocarcinoma	67
<i>O.O. Ryabaya, A.N. Inshakov, A.A. Malysheva, I.S. Abramov, N.V. Sholina, D.A. Khochenkov, E.V. Stepanova</i> The role of autophagy inhibition in the enhanced cytotoxicity of temozolomide on melanoma cell lines	75
<i>A.S. Makarova, O.M. Krivtsova, M.S. Chesnokov, N.L. Lazarevich</i> Impact of HNF4α disrupted expression on hepatocellular carcinoma cells sensitivity to oncogenic pathways inhibitors	83
<i>S.E. Semina, E.A. Rudenskaya, A.G. Mittenberg, S.V. Shabel'nikov, M.A. Krasil'nikov</i> Exosomes and development of cancer cell resistance to metformin: pilot study	92
<i>L.A. Savluchinskaya, I.A. Bakulin, A.A. Molodyk</i> Erythrocyte diagnosticum as used in revealing malignant process	99
<i>V.V. Delektorskaya</i> Pancreatic neuroendocrine tumors: new aspects of morphological classification (World Health Organization, 2017)	104
NECROLOGY	109

Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами

Л.Г. Соленова, М.Г. Якубовская

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

Контакты: Лия Геннадьевна Соленова lsolenova@mail.ru

В России многочисленные контингенты работников, занятых в сфере здравоохранения, могут подвергаться воздействию противоопухолевых препаратов, многие из которых являются канцерогенными. Загрязнение рабочей среды медицинских работников лекарственными противоопухолевыми препаратами связано с функционированием всей внутрибольничной системы от этапа их доставки до утилизации медицинских отходов. Это подтверждается данными мониторинга загрязнения химиопрепаратами внутрибольничной среды с использованием современных методов анализа, выполненного в разных странах. Результат ежедневной и многолетней профессиональной экспозиции медицинского персонала к химиопрепаратам может реализоваться в виде цитотоксических эффектов, нарушения репродуктивной функции и повышения онкологического риска. Показано увеличение риска врожденных пороков развития у детей, спонтанных аборт у работниц при профессиональной экспозиции к цитостатикам. По данным эпидемиологических исследований, у женского персонала, имевшего контакт с этими препаратами, чаще наблюдалось повышение риска возникновения рака молочной железы и других злокачественных новообразований. Об этом также свидетельствуют данные онкологической заболеваемости фармацевтов и лабораторных работников с возможной профессиональной экспозицией к химиопрепаратам. В России необходимы контроль онкологической заболеваемости у медицинских работников и мониторинг загрязнения химиопрепаратами рабочей среды на постоянной основе, так как проецировать оценки, полученные в других странах, на производственные условия, имеющие место в отечественных онкологических учреждениях, неправомерно. Данные биологического и эпидемиологического мониторинга должны стать основой эффективной профилактики возможных рисков здоровью лиц, работающих с противоопухолевыми препаратами в нашей стране.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, профессиональная экспозиция, профессиональные группы, репродуктивные нарушения, онкологический риск, мониторинг

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-10-20

Chemotherapy: some potential risks under antineoplastic drugs handling

L.G. Solenova, M.G. Yakubovskaya

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

There is a large number of healthcare workers who may be exposed to anticancer drugs in different healthcare settings in Russia. Contamination of working environment, throughout the hospital medication system from hospital pharmacy to medical waste facilities, is found in a number of studies. Monitoring of the environmental contamination with these drugs was performed by different methods in various countries. Daily uptake of the anticancer drugs by the personnel exposed for many years may be realized in reproductive impairments and increased cancer risk. The female healthcare workers who handle antineoplastic drugs showed a greater risk of birth defects in offspring, spontaneous abortions, breast cancer and a number of other cancer site revealed by epidemiological methods. Data on the cancer incidence of pharmacists and laboratory workers potentially exposed to the cytostatic drugs are provided. In Russia, the monitoring of occupational cytostatic exposure is required as it would not be correct to apply data obtained in other countries to the Russian conditions. The data for biological and epidemiological monitoring are considered as the background for effective prevention of adverse health effects in healthcare personnel exposed to antineoplastic drugs

Key words: antineoplastic drugs, occupational exposure, occupations, reproductive impairments, cancer risk, monitoring

В России, по статистическим данным, численность врачей в 2015 г. составила 543 604, а среднего медицинского персонала — 1 309 846 человек [1]. Эта многочисленная профессиональная группа весьма разнородна по условиям труда и характеру производственных воздействий. Больничная среда содержит широкий спектр

соединений и их смесей, обладающих обширным диапазоном неблагоприятных воздействий на человека: от острых токсических эффектов до нарушения репродуктивной функции и повышения онкологического риска. Немалая доля медицинских работников занята лечением онкологических больных и в условиях

использования современных методов диагностики и лечения подвергается воздействию вредных профессиональных факторов: ионизирующего и неионизирующего излучения, химиотерапевтических средств. По данным на 2016 г., в лечебно-профилактических учреждениях России работали 7271 онколог, 1247 радиологов и 314 радиотерапевтов [2].

По классификации Международного агентства по изучению рака 14 химиопрепаратов отнесены к доказанным канцерогенам и ряд цитостатиков – к весьма вероятным канцерогенам для человека [3, 4]. Объем научной литературы, посвященной экспозиции различных групп медицинских работников к противоопухолевым препаратам и ее последствиям, чрезвычайно велик. В последние 20 лет данная проблема интенсивно изучается в разных странах. Центр по борьбе с болезнями и профилактике при Национальном институте медицины труда США регулярно публикует на своем сайте перечни научных работ, посвященных изучению последствий вредных воздействий производственной среды на медицинский персонал. В одной из недавних таких публикаций приведен обширный (более 200) список работ, посвященных различным аспектам этой чрезвычайно актуальной проблемы [5]. Несмотря на то что почти 40 лет известно о риске различных нарушений здоровья медицинских работников, связанном с профессиональным воздействием химиопрепаратов, проблема остается актуальной по ряду причин. Онкологическая заболеваемость продолжает расти, что, в свою очередь, определяет рост использования противоопухолевых препаратов. Современная практика безопасного обращения с ними не обеспечивает полного устранения возможного риска, существующего для персонала в различных больничных условиях. Наряду с онкологией цитостатики находят все большее применение в других областях медицины, что ведет к расширению профессиональных контингентов, подвергающихся их воздействию.

Профессиональные группы, подвергающиеся воздействию химиопрепаратов

Работники онкологических учреждений – профессиональный контингент, вероятность производственного воздействия на который канцерогенных химиотерапевтических средств наиболее высока. Однако химиопрепараты назначают не только онкологическим больным, в настоящее время их широко применяют и для лечения целого ряда неонкологических заболеваний (табл. 1).

Большая группа фармацевтических работников имеют непосредственный контакт с противоопухолевыми препаратами при их производстве, хранении, доставке, фасовке и отпуске в лечебные подразделения. Работники научно-исследовательских учреждений, изучающие вопросы канцерогенеза и лечения опухолей, в ходе экспериментальных исследований также подвергаются воздействию канцерогенных факторов, включая химиопрепараты. В таких учреждениях и работники вивария, обеспечивающие уход за экспериментальными животными, имеют контакт с их шерстью и экскрементами, которые могут быть загрязнены канцерогенными веществами [7].

Еще одной группой, которая может подвергаться воздействию противоопухолевых препаратов, являются врачи и персонал ветеринарных клиник, в практике которых могут быть животные, страдающие онкологическими заболеваниями [8].

Уровни экспозиции работников к противоопухолевым препаратам

По имеющимся данным, к настоящему времени количественная оценка содержания химиопрепаратов в больничной среде дана для менее чем 5 % препаратов, используемых в клинической практике, в то время как показано, что их упаковка при поступлении от производителя в 100 % случаев загрязнена исходными веществами [9, 10].

Таблица 1. Противоопухолевые препараты, применяемые в разных областях медицины (адаптировано из [6])

Область медицины	Препарат
Ревматология	Циклофосфамид, азатиоприн, ритуксимаб, абатацепт, такролимус
Трансплантология	Циклоспорин, такролимус, сиролимус, микофенолат
Инфекционные болезни	Ганцикловир
Акушерство/гинекология	Метотрексат
Урология	Митомицин, валрубицин
Хирургия глаза, мочевого пузыря, трахеи	Митомицин
Отделение скорой помощи	Метотрексат
Офтальмология	Митомицин
Общая фармацевтическая сеть	Все перечисленные выше препараты в твердой дозированной лекарственной форме

На уровень экспозиции медицинского персонала к противоопухолевым препаратам влияют следующие факторы:

- характер работы (приготовление лекарства, введение, удаление отходов и др.);
- количество изготавливаемого препарата;
- частота и длительность работы с препаратом;
- вероятность адсорбции препарата кожными покровами работника;
- использование вентилируемых боксов, ламинарных шкафов, биологически безопасных камер;
- использование средств индивидуальной защиты;
- опыт работы, формирующий защитный характер профессионального поведения при обращении с противоопухолевыми препаратами.

Контакт работника с химиопрепаратами возможен при ингаляционном поступлении образующегося аэрозоля, паров препарата при приготовлении лекарственной формы для введения больным, попадании на кожу при соприкосновении с упаковочными поверхностями, загрязненными флаконами, шприцами, брызгами при выполнении инъекций, случайными уколами шприцом и биологическими средами пациентов (кровью, мочой, экскрементами, рвотными массами) и др. Не исключено и пероральное поступление в случае загрязнения рук.

Степень риска здоровью работника, которую могут представлять химиопрепараты, зависит от их лекарственной формы. Таблетки из прессованного порошка, не покрытые оболочкой, являются источником наиболее интенсивного выделения частиц препарата в воздух рабочей зоны с образованием аэрозоля и создают непосредственную угрозу ингаляционного поступления в организм работника. Примерами подобного рода являются прессованные лекарственные формы циклофосфида (ЦФ), метотрексата, мелфалана, 6-меркаптопурина и др. Капсулированные и покрытые оболочкой препараты представляют меньший риск, однако в случае нарушения оболочки капсулы или

разрушения таблетки высока вероятность загрязнения рабочих поверхностей препаратом и поступления его в больничную среду. Цитостатиками может быть загрязнена наружная поверхность флакона (например, от 0,5 нг до 2,4 мкг на флакон 5-фторурацила), внутренняя поверхность упаковки-блистера, при вскрытии которого препарат поступает в зону дыхания работника [6, 11, 12].

В производственной среде медицинских учреждений наблюдается широкий диапазон уровней загрязнения. Как правило, наиболее высокие концентрации химиопрепаратов обнаруживаются в производственных помещениях аптек (табл. 2). В Германии были обследованы 102 аптеки на содержание в производственной среде препаратов платины (1008 проб) и 5-фторурацила (1237 проб). Самые высокие концентрации обнаружены на полках, где хранятся препараты, и на поверхности пола [13].

Изучение устойчивости к деградации метотрексата, паклитаксела, ЦФ, 5-фторурацила и оксалиплатина при попадании их на поверхности из нержавеющей стали в условиях больничной среды показало, что они стабильны в течение 48 ч. Деградация их усиливалась только спустя 144 ч, т. е. в течение 6 сут после поступления во внешнюю среду они могут сохранять свои негативные свойства [19]. Менее устойчивым оказался винкристин, статистически значимое снижение концентрации которого ($p < 0,05$) в результате деградации наблюдалось в течение 48 ч. Метод определения содержания ЦФ и ифосфида в пыли, удаляемой с помощью фильтровальных дисков с последующим их анализом, чаще всего используется при мониторинге загрязнений окружающей среды. Другим подходом к оценке экспозиции к химиопрепаратам является определение их содержания в моче медицинского персонала. В некоторых исследованиях показана связь загрязнения рабочих поверхностей с присутствием препаратов в моче персонала [20]. По результатам канадского обследования медицинского персонала онкологического подразделения, в котором использовался ЦФ, 55 % из 201 пробы мочи содержали его выше

Таблица 2. Содержание некоторых химиопрепаратов в производственной среде медицинских учреждений

Вещество	Помещение	Концентрация (среднее значение), пк/см ²	Страна [ссылка]
Платина	Аптека	0,2–1,7 (0,57)	ФРГ [13]
5-фторурацил	Аптека	2,5–10 000 (5,34)	ФРГ [13]
Циклофосфамид	Больница (туалет для пациентов)	до 95 000	Швеция [14]
	Больница	0,05–10 800 (3,3)	Швеция [15]
	Больница	75-й перцентиль: 10,8; 6,9	Канада [16–18]
	Ветеринарная лечебница	до 2400	США [8]
Ифосфамид	Больница	0,13–95 000 (4,2)	Швеция [15]

уровня чувствительности метода (0,050 нг/мл), а его средняя концентрация составила 0,156 нг/мл. Воздействие цитостатиков может распространяться и на персонал, непосредственно не занятый в проведении медицинских процедур. Так, наибольшая доля проб мочи с его содержанием, превышающим предел чувствительности метода, была обнаружена в группе, состоящей из волонтеров, онкологов, вспомогательного персонала, диетологов, а не в группе персонала, непосредственно занятого введением препарата больным [21].

Остается открытым вопрос о том, какой из методов мониторинга (содержание химиопрепаратов в поверхностных образцах или моче персонала) адекватно отражает экспозицию. Анализ данных 21 исследования, в котором были использованы оба метода мониторинга одних и тех же противоопухолевых препаратов, показал отсутствие статистически значимой корреляции между их результатами. В то же время наблюдалось снижение уровня исследуемых препаратов, зафиксированное обоими методами, после введения защитных мер [22]. Таким образом, результаты обоих методов целесообразно рассматривать в качестве индикаторов присутствия химиопрепаратов в больничной среде.

Методы оценки воздействия химиопрепаратов на медицинский персонал

Противоопухолевая терапия канцерогенными цитостатиками ставит вопрос о том, насколько она безопасна для персонала. Генотоксичность многих цитостатиков известна давно. На основании этого эффекта и эпидемиологических данных о повышенном риске развития вторых первичных опухолей у онкологических пациентов, прошедших химиотерапию, они и отнесены к доказанным канцерогенам для человека [23, 24]. Не обладая селективностью по отношению к раковым и здоровым клеткам, генотоксичные противоопухолевые препараты вызывают широкий спектр побочных эффектов у пациентов, а также могут вызывать те же эффекты у медицинских работников как результат ежедневной и многолетней профессиональной экспозиции [25]. Безусловно, уровни воздействия, которым подвергается персонал, проводящий химиотерапию, во много раз меньше терапевтических доз, используемых у онкологических больных в процессе лечения. Однако продолжительное воздействие на персонал малых доз в конечном итоге может проявиться в виде кумулятивного канцерогенного или тератогенного эффекта. Несмотря на принимаемые меры безопасности, медицинский персонал полностью не защищен от воздействия противоопухолевых препаратов: их следы обнаруживаются по всей цепочке внутрибольничной системы: от этапа доставки до удаления отходов [26].

Исследования загрязнения противоопухолевыми препаратами внутрибольничной среды, проведенные в разных странах, свидетельствуют о том, что контакт с ними медицинского персонала в той или иной степени неизбежен [27]. Для оценки их воздействия

на медицинский персонал применяются следующие подходы:

- определение уровня генотоксического повреждения;
- выявление нарушений репродуктивной функции;
- оценка степени онкологического риска в связи с экспозицией к химиотерапевтическим препаратам.

Определение уровня генотоксического повреждения.

При повреждении ДНК частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови и слущенных клетках буккального эпителия, а также число микроядер выше у экспонированных, чем у контрольной группы. Главный недостаток методов их определения заключается в отсутствии специфичности эффектов, которые могут наблюдаться при воздействии любого генотоксичного агента: различных химических соединений, включая табакоспецифические канцерогены, определенные типы радиации, вирусные инфекции. Невозможно также отделить влияние возраста, поведенческих (курения, питания и др.) и других факторов на результаты тестирования. Тем не менее более половины из превышающих сотню опубликованных к 2013 г. работ свидетельствуют о статистически значимой связи профессиональной экспозиции к химиопрепаратам с изучаемыми генотоксическими эффектами [28]. Несмотря на указанные недостатки, тестирование медицинского персонала по показателям генотоксического повреждения широко применяется в современной практике оценки воздействия химиопрепаратов, так как дает быстрый ответ не только на присутствие генотоксического агента в производственной среде, но, что более важно, идентифицируют реакцию организма работника, являясь ориентиром потенциального канцерогенного риска. В условиях применения современных средств защиты персонала от воздействия противоопухолевых препаратов, даже в случаях, когда уровень их содержания в больничной среде ниже чувствительности определения физико-химическими методами, тесты на генотоксическое повреждение по-прежнему остаются незаменимым инструментом мониторинга, позволяющим проводить оценку текущего уровня экспозиции к химиопрепаратам [29–31]. Поскольку тесты по определению уровня хромосомных aberrаций и микроядер в клетках обследуемого персонала дают представление об общем генотоксическом поражении, то именно они использовались для оценки эффекта множественных и комплексных экспозиций, создаваемых присутствием противоопухолевых препаратов в производственной среде. Наибольшее количество исследований к настоящему времени проведено с помощью теста на хромосомные aberrации, который рассматривается в качестве «золотого стандарта» [32].

В последнее 10-летие для оценки уровня повреждения ДНК широкое распространение в различных

исследованиях получил «комет-тест» — менее трудоемкий и более дешевый метод выявления генотоксического повреждения [33–35]. В 2014 г. он был законодательно введен для тестирования фармакологических препаратов на канцерогенную опасность в странах Организации экономического сотрудничества и развития [36, 37]. Данные, полученные с помощью «комет-теста» с использованием лимфоцитов медицинских сестер, работающих с генотоксичными противоопухолевыми препаратами, свидетельствуют о повышении уровня генотоксического повреждения медицинского персонала в среднем на 30 % по отношению к контрольной группе людей [38, 39].

Противоопухолевые препараты вызывают образование большого числа свободных радикалов, поражающих молекулы белков, липидов, нуклеиновых кислот, что, в конечном итоге, ведет к окислительному (оксидативному) стрессу. Наиболее выражено он может проявляться у онкологических больных в виде побочных эффектов химиотерапии. Показатели окислительного стресса также используются для оценки раннего токсического эффекта химиопрепаратов. Их статистически значимые различия у медицинских сестер, имеющих контакт с этими препаратами, по сравнению с контрольными лицами дают основания предполагать, что у персонала с экспозицией к противоопухолевым препаратам наблюдается окислительный стресс менее явный, чем у онкологических больных. Однако это не исключает возможности его реализации в виде клинически выраженной патологии в последующем [40, 41].

Оценка влияния профессиональной экспозиции к противоопухолевым препаратам на репродуктивную функцию медицинских работников. Влияние на репродуктивную функцию женщин — один из аспектов, которому уделяется существенное внимание применительно к характеристике вредных последствий профессионального контакта с химиопрепаратами. Репродуктивная система — наиболее уязвима при действии этих соединений. Особенно оно сказывается на развитии плода, так как гипотетически химиопрепараты оказывают такой же эффект на растущий плод, как и на быстро пролиферирующие раковые клетки. В исследованиях, проведенных до 1990 г., отсутствуют описания мер предосторожности при работе с противоопухолевыми препаратами, и можно полагать, что они были менее строгими, чем в последующие годы. Несмотря на то, что исследования были проведены в разных странах с использованием различных эпидемиологических методов, в большинстве из них отмечался статистически значимый повышенный риск спонтанных аборт и врожденных пороков развития (ВПР) у потомства медицинского персонала с экспозицией к цитостатикам ($p < 0,05$) [42–47].

В отечественном исследовании, проведенном в НИИ медицины труда РАМН показано, что при профессиональной экспозиции матери до зачатия ребенка к анестетикам и цитостатикам повышение относи-

тельного риска (ОР) ВПР в 3,3 раза у детей было статистически значимым (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,3–8,5), у детей отцов с аналогичной экспозицией такое же повышение риска было незначимо (ОР 3,2; 95 % ДИ 0,6–18,8) [48].

Нарушение репродуктивной функции наблюдается и у женщин других профессиональных групп, имеющих производственный контакт с цитостатическими препаратами. По данным австралийского исследования, включавшего 321 женщину-ветеринара (633 беременности), у тех из них, кто в течение беременности имел дело с цитостатиками, в 2 раза статистически значимо был повышен риск ВПР у детей (ОР 2,08; 95 % ДИ 1,05–4,15) [49].

Метаанализ результатов нескольких эпидемиологических исследований повышает статистическую значимость доказательства причинно-следственных связей, если таковые обнаруживаются. Из исследований, опубликованных в 1966–2004 гг., в которых был изучен данный аспект, были выбраны 7 работ, отвечающих критериям включения в данный метаанализ. Он выявил увеличение риска ВПР у детей в 1,64 раза, близкое к уровню статистической значимости (95 % ДИ 0,91–2,94) и незначимое повышение частоты мертворождений (ОР 1,16; 95 % ДИ 0,73–1,82). Статистически значимо оказался увеличен риск спонтанных аборт (ОР 1,46; 95 % ДИ 1,11–1,96) [50]. Совокупный анализ исследований, проведенных к февралю 2014 г., посвященных изучению этого аспекта, и обширных материалов специализированных электронных баз данных дал аналогичные результаты: незначимое повышение риска ВПР и статистически значимое повышение риска спонтанных аборт — ОР 1,46 (95 % ДИ 1,11–1,92) [51]. Среди многочисленных причин спонтанного прерывания беременности немаловажное место занимают хромосомные и другие аномалии плода, несовместимые с дальнейшим его развитием или ведущие к ВПР, которые могут быть вызваны генотоксичностью противоопухолевых препаратов. На индивидуальном уровне это проявляется в виде определенной патологии, а на популяционном — оборачивается существенными социальными потерями.

В контексте профессионального воздействия противоопухолевых препаратов на потомство немаловажным представляется их влияние на онкологический риск у детей. В исследовании, проведенном в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, повышенный в 1,8 раза ($p < 0,01$) риск развития злокачественных новообразований (ЗН) был выявлен у детей, чьи матери до зачатия имели профессиональный контакт с медицинскими препаратами, а также работавших лаборантами (ОР 1,7; $p < 0,05$). У детей отцов тех же профессиональных групп повышение риска ЗН было статистически незначимым. Из-за малого числа случаев не было возможности выделить медицинских работников, контактировавших с отдельными группами медицинских препаратов [52].

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости мониторинга репродуктивных нарушений в профессиональных контингентах, подвергающихся воздействию противоопухолевых препаратов.

Онкологический риск у медицинских работников с экспозицией к противоопухолевым препаратам. В характеристике, определяющей опасность лекарственных препаратов для персонала, канцерогенность стоит на 1-м месте. Тем не менее риск возникновения ЗН у медицинского персонала, контактирующего с противоопухолевыми препаратами, исследовался в небольшом числе работ вследствие трудности разделения экспозиции к противоопухолевым препаратам и другим неблагоприятным профессиональным воздействиям. Описаны случаи ЗН у лиц, имевших длительный контакт с препаратами против рака мочевого пузыря, назофарингеальной карциномы [53, 54]. По данным датского канцер-регистра, статистически незначимо повышен риск лейкозов (ОР 2,85; 95 % ДИ 0,51–16,02) у врачей, проработавших не менее 6 мес в отделениях, где лечили онкологических больных [55]. Преобладающее число работ посвящено изучению риска ЗН у медицинских сестер, как наиболее подверженной воздействию цитостатиков профессиональной группе. В Канаде прослежена когорта из 56 213 медицинских сестер, проработавших в профессии не менее 1 года в период 1974–2000 гг. У тех из них, кто когда-либо работал в онкологическом центре или онкологических отделениях, по сравнению с другими медицинскими сестрами, наблюдалось статистически значимое повышение риска рака молочной железы (РМЖ) (ОР 1,83; 95 % ДИ 1,03–3,23) и рака прямой кишки (ОР 1,87; 95 % ДИ 1,07–3,29) [47].

Повышенный риск РМЖ прослеживается и в других, менее масштабных работах. В исследовании, проведенном в Исландии методом случай–контроль внутри когорты, у медицинских сестер наблюдалось статистически значимое повышение почти в 3 раза риска РМЖ (ОР 2,83; 95 % ДИ 1,03–7,81). При учете подразделений, в которых они работали, самый высокий, но статистически незначимый риск, был у медицинских сестер, работавших с цитостатиками (ОР 1,65; 95 % ДИ 0,53–5,17). Однако статистически значимых различий между подразделениями не наблюдалось [56].

В России этим же методом проведено исследование среди сотрудников РОНЦ им. Н.Н. Блохина со стажем работы в данном учреждении не менее 5 лет. У сотрудниц, имевших производственный контакт с противоопухолевыми препаратами, риск РМЖ и лейкозов был выше, хотя различия были статистически незначимы (для РМЖ – ОР 1,7; 95 % ДИ 0,7–4,6; для лейкозов – ОР 2,1; 95 % ДИ 0–92). У мужчин этой группы повышения общего риска ЗН и риска ЗН отдельных локализаций не наблюдалось [57].

Результаты исследования загрязнения рабочих мест в медицинских учреждениях свидетельствуют о том,

что наиболее высокие концентрации химиопрепаратов обнаруживаются в аптечных помещениях, и это делает фармацевтов группой повышенного онкологического риска. Экспозиция данной профессиональной группы включает не только противоопухолевые препараты, но и другие канцерогенные соединения (растворители, дегти, формальдегид и т. д.), эффекты которых трудно разделить. Онкологическая заболеваемость в когорте из 8499 фармацевтических работников (ассистентов и фасовщиц) прослежена в период 1970–1990 гг. в Дании по национальному канцер-регистру. Общая онкологическая заболеваемость в когорте не отличалась от популяционной. В 1,5 раза был статистически значимо повышен риск немеланомного рака кожи (95 % ДИ 1,1–2,1), особенно в группе с большим стажем работы ассистентом (ОР 2,8; 95 % ДИ 1,6–4,6). Незначимо повышенный риск неходжкинской лимфомы был выявлен у ассистентов (в 1,7 раза) и фасовщиц (в 2,4 раза). В подгруппе фасовщиц со стажем работы в профессии не менее 15 лет он был почти 4-кратно статистически значимо повышен (ОР 3,7; 95 % ДИ 1,2–8,9). В аналогичной подгруппе ассистентов данные опухоли не наблюдались. Авторы объясняют это молодым составом ассистентов, у 2/3 которого латентный период развития неходжкинской лимфомы (около 20 лет) не достигнут. Полученные результаты не позволили связать показатели риска с определенными профессиональными факторами [58].

Как отмечалось выше, работа в биомедицинских лабораториях сопряжена с воздействием широкого спектра мутагенных и канцерогенных химических, физических и биологических агентов. Не исключено и воздействие химиопрепаратов. По данным санитарно-гигиенической паспортизации РОНЦ им. Н.Н. Блохина, проведенной в 2002 г., на тот момент 265 сотрудников его научно-исследовательских лабораторий имели производственный контакт с различными химическими канцерогенами, включая цитостатики [57]. Актуальность изучения онкологического риска у работников медицинских и биологических лабораторий несомненна, но ситуация с оценкой экспозиции в этой группе еще сложнее, чем у фармацевтов, так как спектр профессиональных воздействий шире за счет не только разнообразных химических, но и физических, и биологических факторов. Характерным результатом длительного прослеживания больших контингентов лабораторных работников в Финляндии, Швеции, США и Израиле является сниженный общий риск возникновения ЗН по сравнению с населением. Это может быть объяснено «эффектом здорового рабочего», при котором происходит самоотбор лиц в данную профессиональную группу с изначально более хорошими показателями здоровья и меньшей распространенностью вредных привычек [59–64]. Повышенный риск ряда локализаций ЗН, отмеченный в приведенных работах, не достигал статистической значимости. Исключение составил РМЖ. У работниц шведских

и израильских лабораторий выявлен статистически значимо повышенный его риск, особенно у лиц с длительным (>10 лет) стажем работы в химических лабораториях [60, 64, 65]. Анализ результатов 45 исследований работников биологических лабораторий обнаружил пониженный общий онкологический риск и широкий диапазон риска рака поджелудочной железы (0,5–6,3), головного мозга (0,7–9,4) и неходжкинской лимфомы (0,6–51,5). Ограничения, касающиеся интерпретации результатов большинства исследований, – низкая статистическая значимость показателей риска и неопределенность ретроспективной оценки экспозиции [66].

Подходы к профилактике производственного воздействия химиопрепаратов

Из методов санитарно-гигиенической профилактики наиболее эффективным было бы полное устранение химиопрепаратов из производственной среды, но достижение нулевого уровня вряд ли возможно. Предельно допустимые концентрации противоопухолевых препаратов в рабочей зоне до сих пор не установлены ни в США, ни в странах Европы [67]. На основе мониторинга загрязнения аптечных помещений в Германии предложена допустимая ориентировочная величина 5-фторурацила на уровне 0,1 нг/см², концентрации которого были наиболее высокими (0,117 нг/см²), как индикатора присутствия цитостатиков в производственной среде [68]. Вместе с тем предлагаются основанные на генотоксичности новые подходы к определению порога действия и установлению предельно допустимых концентраций цитостатиков для производственных условий [69].

На сегодняшний день ограниченность эпидемиологических данных, характеризующих причинно-следственные связи между воздействием химиопрепаратов и онкологическим риском у медицинского персонала, побудила использовать широко практикуемую методологию оценки риска, позволяющую рассчитать вероятность возникновения нежелательного эффекта в результате воздействия какого-либо вредного фактора на конкретную группу людей при специфических условиях экспозиции. По расчетам американских авторов, годовой риск рака мочевого пузыря и лейкозов у мужчин и лейкозов у женщин от экспозиции к ЦФ примерно одинаков и находится в диапазоне от 1,4 до 10,0 дополнительных случаев на 1 млн в год [70]. По данным голландских исследователей, показатель риска при каждом воздействии ЦФ в течение 40 лет при среднем уровне экспозиции составил 0,27 (диапазон 0–40) дополнительных случаев лейкоза на 1 млн онкологических медицинских сестер в год. Не исключено, что при несоответствующих условиях труда и более высоких уровнях воздействия базовый уровень риска (1 дополнительный случай лейкоза на 10 млн в год) может быть превышен [71]. Следует отметить широкий диапазон оценок и то, что они касаются

только ЦФ и уровней его содержания в рабочей зоне медицинских учреждений, зафиксированных в США и Нидерландах, где в медицинскую практику введены строгие меры по охране труда при работе с противоопухолевыми препаратами (специальные закрытые транспортные системы и биологически безопасные камеры, строгие правила использования средств индивидуальной защиты). Поэтому нельзя переносить эти оценки на медицинский персонал, имеющий производственный контакт с другими противоопухолевыми препаратами и работающий в других, менее безопасных, условиях труда.

Вопросы оценки экспозиции к противоопухолевым препаратам, разработки профилактических мер, направленных на минимизацию ее воздействия на медицинский персонал исключительно актуальны для нашей страны. Приведенная выше штатная численность онкологов в России явно не отражает истинное число работников, экспонированных к противоопухолевым препаратам. Ведущаяся в стране паспортизация канцерогеноопасных организаций, нацеленная на оценку численности профессиональных контингентов, подвергающихся воздействию канцерогенных факторов на рабочем месте, практически не затронула медицинские учреждения. Единственной организацией, где она была проведена, стал РОНЦ им. Н.Н. Блохина [72]. Результаты паспортизации показали, что 21 % ($n = 606$) работавших имели производственный контакт с противоопухолевыми препаратами. В их число не были включены санитарки, уборщицы и другой вспомогательный персонал, а как свидетельствуют приведенные выше данные, загрязнение пола, мебели в онкологических подразделениях существенно расширяет контингент лиц, которые могут подвергаться воздействию цитостатиков. Таким образом, медицинские учреждения, где имеет место их использование, необходимо включить в процесс паспортизации канцерогеноопасных организаций, которая ведется в стране в рамках социально-гигиенического мониторинга и направлена на профилактику профессиональных канцерогенных воздействий.

В сложившейся ситуации можно дать только косвенную оценку численности этих контингентов в России. По данным переписи населения США, на конец 1990-х годов число лиц, профессионально экспонированных к действию опасных лекарственных препаратов, превышало 5,5 млн. В это число вошли работники, занятые в их производстве, транспортировке, обращении с ними в лечебных учреждениях вплоть до удаления отходов [73]. Население России в 2,2 раза меньше, чем в США [74], но при всей условности сопоставлений можно ожидать, что в нашей стране число лиц с профессиональной экспозицией к опасным лекарственным препаратам может составлять сотни тысяч человек. Предположительно, что многие тысячи из них могут иметь контакт с противоопухолевыми препаратами на ра-

бочем месте. Критическая ситуация наблюдается в отношении научного обоснования мер профилактики: отсутствуют отечественные работы по оценке экспозиции к цитостатикам и риска ее неблагоприятных последствий для медицинского персонала. Для сравнения: на сайте Национального института медицины труда США приведен перечень 129 зарубежных исследований, выполненных только за последние 3 года (2014–2016), посвященных актуальным вопросам обращения с противоопухолевыми препаратами [75]. Как уже указывалось, неправомерно проецировать оценки, полученные в других странах, на производственные условия, имеющие место в отечественных онкологических учреждениях.

Номенклатура противоопухолевых препаратов постоянно расширяется. Все большее распространение получают таргетные препараты. Известны острые симптомы, кардиопатия, которые возникают у пациентов при лечении таргетными препаратами. В отношении медицинского персонала таких данных нет. К этим препаратам неприменимы критерии, принятые для классификации цитостатиков (генотоксичность, канцерогенность). Озабоченность вызывает и экспозиция персонала к моноклональным антителам, широко вошедшим в онкологическую практику и характеризующихся такой же неопределенностью относительно их классификации. Они упоминаются лишь в малом числе руководств по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами. С учетом увеличения применения указанных препаратов явно назрела необходимость разработки методов оценки экспозиции и мер предосторожности при работе с ними [76, 77].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что проблема безопасного обращения с химиопрепаратами остается актуальной, так как несмотря на принимаемые меры, возможность поступления их в рабочую среду сохраняется, создавая опасность контакта с ними медицинского персонала. Если ее нельзя полностью устранить, то следует по возможности минимизировать [78]. Руководства по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами существуют во всех развитых странах, включая и Россию [79]. Руководство, не являясь нормативным документом, носит рекомендательный характер, но в США, например, в 2013 г. в ряде штатов (Вашингтон, Калифорния и Северная Каролина) в стадии принятия находились законы, обязывающие работодателей строго выполнять требования Руководств по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами и защите персонала с соответствующими юридическими последствиями при их неисполнении [6]. Руководства периодически перерабатываются с учетом новых научных данных и изменений условий труда, с введением новых средств и технических устройств, позволяющих снизить опасность экспозиции, с вводом в лечебную

практику новых противоопухолевых препаратов. В рекомендациях Европейской комиссии 2016 г., отражающих ее политику в области профилактики возможных рисков при работе с цитостатиками, их профилактика определена как долгосрочная стратегия, обеспечивающая устойчивость и гибкость здравоохранительной системы Европейского союза. В рекомендациях указывается на необходимость разработки законодательных и технических мер, направленных на охрану здоровья работающих, а также мониторинг на постоянной основе экспозиции к цитостатикам и его эффективное внедрение в странах Европейского союза [80].

В России к 2015 г. 35 лекарственных препаратов внесены в список канцерогенных веществ в отечественный нормативный документ – Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы «Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности» [4]. Согласно гигиенической классификации условий труда работа с противоопухолевыми лекарственными средствами независимо от их концентрации в воздухе рабочей зоны отнесена к классу вредности 3.4, т. е. наиболее вредному [81]. Вместе с ратифицированной в 2017 г. Конвенцией 139 Международной организации труда «О профилактике и контроле профессиональных рисков, вызываемых канцерогенными веществами и агентами», законодательными актами России, направленными на охрану здоровья работающих, эти документы составляют нормативно-правовую основу профилактики ЗН при работе с канцерогенными лекарственными препаратами, а также реализации права работника на безопасные условия труда.

В условиях невозможности достижения нулевого содержания цитостатиков в производственной среде особую значимость приобретает техническое оснащение онкологических учреждений биологически безопасными кабинетами, закрытыми системами транспортировки химиопрепаратов внутри больничной сети и прочими техническими средствами, ограничивающими контакт персонала с ними. Административный контроль должен включать проведение обязательного инструктажа работников для информирования их об опасности химиопрепаратов и формирования осознанной необходимости профессионального поведения с использованием средств индивидуальной защиты, строгом соблюдении правил техники безопасности, исключая небрежность при работе с данными препаратами. Помимо строгого выполнения уже существующих рекомендаций [79], необходимо иметь собственные данные мониторинга производственной среды, оценки риска нарушения здоровья для различных профессиональных групп и производственных условий в целях разработки и внедрения адекватных мер профилактики, встроенных в систему здравоохранения страны.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ресурсы и деятельность медицинских организаций здравоохранения. 1-я часть (Медицинские кадры). М., 2016. 270 с. [Resources and activities of health care organizations. 1st part (Medical staff). Moscow, 2016. 270 p. (In Russ.)].
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2016. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2017. 236 p. (In Russ.)].
3. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Available at: Monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listofclassification.pdf.
4. СанПиН 1.2.2353-08. Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности. М., 2008. [Sanitary rules and regulations 1.2.2353-08. Carcinogenic factors and basic requirements for the prevention of carcinogenic hazards. Moscow, 2008. (In Russ.)].
5. NIOSH. Center for disease control and prevention. Occupational exposure to antineoplastic agents and other hazardous drugs. Available at: <http://www.cdc.gov/NIOSH/topics/antineoplastic/effects.html#associate>.
6. Roussel C., Connor Th. Chemotherapy: current and emerging issues in safe handling of antineoplastic and other hazardous drugs. *Oncol Pharm Safety* 2014;7:1; 8–11.
7. Соленова Л.Г., Дымова Е.Г. Особенности паспортизации лечебно-профилактических и научно-исследовательских учреждений. *Медицина труда и промышленная экология* 2004;(7):35–8. [Solenova L.G., Dumova E.G. Features of certification of medical and preventive and research institutions. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Medicine and Industrial Ecology* 2004;(7):35–8. (In Russ.)].
8. Couch J., Gibbins J., Connor T. Evaluation of chemotherapy drug exposure at a veterinary teaching hospital in Michigan. *J Occup Environ Hyg* 2013;10(4):45–51.
9. Pethran A., Schierl R., Hauff K. et al. Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations. *Int Arch Occup Environ Health* 2003;75(75):5–10.
10. Connor T.H., DeBord D.G., Pretty J.R. et al. Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. *J Occup Environ Med* 2010;52:1019–27.
11. Favier B., Gilles L., Ardiet C., Latour J.F. External contamination of vials containing cytotoxic agents supplied by pharmaceutical manufacturers. *J Oncol Pharm Pract* 2003;9:15–20.
12. Hanada T., Takami Y., Moriyama K. et al. Prevention of the exposure by cyclophosphamide oral tablet. *J Pharm Health Care Sci* 2015;1:20–9.
13. Schierl R., Bohlandt A., Nowak D. Guidance values for surface monitoring of antineoplastic drugs in German pharmacies. *Ann Occup Hyg* 2009;53(7):703–71.
14. Hedmer M., Tinnerberg H., Axmon A., Jonsson B.A. Environmental and biological monitoring of antineoplastic drugs in four workplaces in a Swedish hospital. *Int Arch Occup Environ Health* 2008;81(7):899–911.
15. Hedmer M., Wohlfart G. Hygiene guidance values for wipe sampling of neoplastic drugs in Swedish hospitals. *J Environ Monit* 2012;14(7):1968–75.
16. Berruyer M., Tanguay C., Caron N.J. et al. Multicenter study of environmental contamination with antineoplastic drugs in 36 Canadian hospitals: a 2013 follow-up study. *J Occup Environ Hyg* 2015;12(2):87–94.
17. Janes A., Tanguay C., Caron N.J., Busieres J.F. Environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate: a study of 51 Canadian centres. *Can J Hospital Pharmacy* 2016;68(4):279–89.
18. Poupeau C., Tanguay C., Caron N.J., Busieres J.F. Multicenter study of environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate in 48 Canadian hospitals. *J Oncol Pharm Pract* 2016.
19. Jeronimo M., Colombo M., Astrakianakis G., Hon C.Y. A surface wipe sampling and LC-MS/MS method for the simultaneous detection of six antineoplastic drugs commonly handled by healthcare workers. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(23):7083–92.
20. Sessink P.J., Bos R.P. Drug hazardous to healthcare workers. Evaluation of methods for monitoring occupational exposure to cytostatic drugs. *Drug Safety* 1999; 20(4):347–59.
21. Hon C.Y., Tesche K., Shen H. et al. Antineoplastic drug contamination in the urine of Canadian healthcare workers. *Inter Arch Occup Env Health* 2015;88(7):933–41.
22. Kibby T. A review of surface wipe sampling compared to biologic monitoring for occupational exposure to antineoplastic drugs. *J Occup Environ Hyg* 2017;14(3):159–74.
23. Grosse Y., Baan R., Straif K. et al. Special report: policy. A review of human carcinogens – Part A: Pharmaceuticals, 2009. Vol. 10. Available at: [www/thelancet.com/oncology](http://www.thelancet.com/oncology).
24. Соленова Л.Г. Вторые первичные опухоли у онкологических больных: эпидемиология, роль противоопухолевой терапии. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;(3):30–43. [Solenova L.G. Second primary malignancies in cancer survivors: epidemiology, role of anticancer therapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;(3):30–43. (In Russ.)].
25. Roussel C., Connor Th. Chemotherapy and pharmacy: a toxic mix? *Oncol Pharm* 2013;6(2):1; 32–3.
26. Hon C.Y., Teschke K., Chu W. et al. Antineoplastic drug contamination of surfaces throughout the hospital medication system in Canadian hospitals. *J Occup Environ Hyg* 2013;10(7):374–83.
27. Tilyou S. Cytotoxic drug residues still lurking in health care facilities. *Pharmacy Practice News* 2010;37(1):1–24.
28. Roussel C., Connor T.H. Chemotherapy: biomarkers of exposure, effects, reproductive hazards, and cancer. *Oncol Pharm* 2014;7(1):1; 10–13; 18.
29. Ladeira C., Viegas S., Padua M. et al. Relation between DNA damage measured by comet assay and OGG1 Ser326Cys polymorphism in antineoplastic drug biomonitoring. *AJMS Genetic Epidemiology* 2015;2(3):204–11.
30. Buschini A., Villarini M., Feretti D. et al. Multicentre study for the evaluation of mutagenic/carcinogenic risk in nurses exposed to antineoplastic drugs: assessment of DNA damage. *Occup Environ Med* 2013;70(4):789–94.
31. Moretti M., Grollino M.G., Pavanello S. et al. Micronuclei and chromosome aberrations in subjects occupationally exposed to antineoplastic drugs: a multicentric approach. *Int Arch Occup Environ Health* 2015;88(6):683–95.
32. Suspiro A., Prisna J. Biomarkers of occupational exposure of anticancer agents: a minireview. *Toxicol Lett* 2011;207(1):42–52.
33. Gleit M., Schneider T., Schlormann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol* 2016;90(10):2315–36.
34. Frottschl R. Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. *Mutagenesis* 2015;30(1):51–7.
35. Azqueta A., Slysikova J., Langie S.A. et al. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet* 2014;5:288.
36. Two recently approved *in vivo* Genotoxicity test guidelines. *European Chemicals*

- Agency. Available at: https://echa.europa.eu/documents/10162/21650280/oced_test_guidelines_genotoxicity_en.pdf.
37. OECD Guideline for the testing of chemicals. In vivo mammalian alkaline comet assay. OECD/OCDE TG 489. Adopted: 26 September 2014. DOI: 10.1787/20745788. Available at: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en.
 38. Møller P., Knudsen L.E., Loft S., Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(10):1005–15.
 39. Undeğer U., Başaran N., Kars A., Güç D. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline comet assay. *Mutat Res* 1999;439(2):277–85.
 40. Mahboob M., Rahman M.F., Rekhadevi P.V. et al. Monitoring of oxidative stress in nurses occupationally exposed to antineoplastic drugs. *Toxicol Int* 2012;19(1):20–4.
 41. Gomez-Olivan L.M., Miranda-Mendoza G.D., Cabrera-Galeana P.A. et al. Oxidative stress induced in nurses by exposure to preparation and handling of antineoplastic drugs in Mexican hospitals: a multicentric study. *Oxidative Med Cellular Longevity* 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/858604>.
 42. Selevan S.D., Lindbohm M.L., Hornung R.W., Hemminki K. A study of occupational exposure to neoplastic drugs and fetal loss in nurses. *N Engl J Med* 1985;313(19):1173–8.
 43. Stucker I., Caillard J.F., Collin R. et al. Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. *Scand J Work Environ Health* 1990;16(2):102–7.
 44. Hemminki K., Kyronen P., Lindbohm M.L. Spontaneous abortions and malformations in offspring of nurses exposed to anaesthetic gases, cytostatic gases, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. *J Epidemiol Community Health* 1985;39(2):141–7.
 45. McDonald A.D., McDonald J.C., Armstrong B. et al. Congenital defects and work in pregnancy. *Br J Ind Med* 1988;45(9):581–8.
 46. Scov T., Maarup B., Olsen J. et al. Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling antineoplastic drugs. *Br J Ind Med* 1992;49(12):855–61.
 47. Ratner P.A., Spinelli J.J., Beking K. et al. Cancer incidence and adverse pregnancy outcome in registered nurses potentially exposed to antineoplastic drugs. *BMC Nurs* 2010;9:15–26.
 48. Тихонова Г.И., Рубцова Н.Б., Яковлева Т.П. Условия труда родителей как фактор риска развития врожденных пороков у детей. Безопасность жизнедеятельности 2006;(2):52–7. [Tikhonova G.I., Rubtsova N.B., Yakovleva T.P. Working conditions of parents as a risk factor for the development of congenital malformations in children. *Bezopasnoct' zhiznedeyatel'nosti = Safety of Vital Activity* 2006;(2):52–7. (In Russ.)].
 49. Shirangi A., Bower C., Holman C.D. et al. A study of handling cytotoxic drugs and risk of birth defects in offspring of female veterinarians. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11(6):6216–30.
 50. Dranitsaris G., Johnston M., Poirier S. et al. Are health care providers who work with cancer drugs at an increased risk for toxic events? A systematic review and meta-analysis of literature. *J Oncol Pharm Pract* 2005;11(2):69–78.
 51. Connor T.H., Lawson C.C., Polovich M., McDiarmid M.A. Reproductive health risk associated with occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings: a review of the evidence. *J Occup Environ Med* 2014;56(9):901–10.
 52. Smulevich V.B., Solionova L.G., Belyakova S.V. Parental Occupation and other factors and cancer risk in children: II. Occupational factors. *Int J Cancer* 1999;83(6):718–22.
 53. Levin L.I., Holly E.A., Seward J.P. Bladder cancer in a 39-year-old female pharmacist. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(13):1089–91.
 54. Gabriele P., Airoidi M., Succo G. et al. Undifferentiated nasopharyngeal-type carcinoma in a nurse handling cytostatic agents. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1993;29B(2):153.
 55. Skov T., Lyng E., Maarup B. et al. Risks for physicians handling antineoplastic drugs. *Lancet* 1990;336(8728):1446.
 56. Gunnarsdottir H.K., Aspelund T., Karlsson T., Rafnsson V.V. Occupational risk factors for breast cancer among nurses. *Int J Occup Environ Health* 1997;3(4):254–8.
 57. Соленова Л.Г. Производственные факторы и онкологический риск у онкологов. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2009;20(2):41–7. [Solionova L.G. Occupational factors and cancer risk in oncologists. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN = Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS* 2009;20(2):41–7. (In Russ.)].
 58. Hansen J., Olsen J.H. Cancer morbidity among Danish female pharmacy technicians. *Scand J Work Environ Health* 1994;20:22–6.
 59. Wennborg H., Yuen J., Axelsson G. et al. Mortality and cancer incidence in biomedical laboratory personnel in Sweden. *Am J Ind Med* 1999;35(4):382–9.
 60. Gustavsson P., Reuterwall Ch., Sadigh J., Soderholm M. Mortality and cancer incidence among laboratory technicians in medical research and routine laboratories (Sweden). *Cancer Causes Control* 1999;10(1):59–64.
 61. Gustavsson P., Andersson T., Gustavsson A., Reuterwall C. Cancer incidence in female laboratory employees: extended follow-up of a Swedish cohort study. *Occup Environ Med* 2017;0:1–4.
 62. Kauppinen T., Pukkala E., Saalo A., Sasco A. Exposure to chemical carcinogens and risk of cancer among Finnish laboratory workers. *Am J Ind Med* 2003;44(4):343–50.
 63. Collins J.J., Bender T.J., Bonner E.M. et al. Brain cancer in workers employed at a laboratory research facility. *PLoS One* 9(12):11997.
 64. Shaham J., Gurvich R., Kneshet Y. Cancer incidence among laboratory workers in biomedical research and routine laboratories in Israel: Part I – the cohort study. *Am J Ind Med* 2003;44(6):600–10.
 65. Shaham J., Gurvich R., Kneshet Y. Cancer incidence among laboratory workers in biomedical research and routine laboratories in Israel: Part II – nested case-control study. *Am J Ind Med* 2003;44(6):611–26.
 66. Racht B., Partanen T., Kauppinen T., Sasco A.J. Cancer risk in laboratory workers: an emphasis on biological research. *Am J Ind Med* 2000;38(6):651–65.
 67. Hon C.Y., Barzan C., Astrakianakis G. Identification of knowledge gap regarding healthcare workers' exposure to antineoplastic drugs: review of literature, North America versus Europe. *Saf Health Work* 2014;5(4):169–74.
 68. Kiffmeyer T.K., Tuerk J., Hahn M. et al. Application and assessment of regular environment monitoring of the antineoplastic drug contamination level to pharmacies – the MEWIP Project. *Ann Occup Hyg* 2012;57(4):444–55.
 69. Lovsin Barle E., Winkler G.C., Glowienke S. et al. Setting occupational exposure limits for genotoxic substances in the pharmaceutical industry. *Toxicol Sci* 2016;151(1):2–9.
 70. Sessink P.J., Kroese E.D., van Kranen H.J., Bos R.P. Cancer risk assessment for health care workers occupationally exposed to cyclophosphamide. *Int Arch Occup Environ Health* 1995;67(5):317–23.
 71. Fransman W., Kager H., Meijster T. et al. Leukemia from dermal exposure to cyclophosphamide among nurses in the Netherlands: quantitative assessment of the risk. *Ann Occup Hyg* 2014;58(3):271–82.
 72. Соленова Л.Г. Некоторые итоги паспортизации канцерогеноопасных производств в России в 1999–2007 гг. Гигиена и санитария 2012;(1):19–23. [Solionova L.G. Some results of certification of carcinogenic dangerous production in Russia in 1999–2007. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation* 2012;(1):19–23. (In Russ.)].
 73. NIOSH Publication No. 2004-165: Preventing occupational exposure to antineo-

- plastic and other hazardous drugs in health care settings. Available at: <http://www.cdc.gov/niosh/doxc/2004-165>.
74. World Population Prospects: the 2015 Revision. Vol. I. Comprehensive Tables. New York: United Nations, 2016. 345 p.
75. Occupational exposure to antineoplastic agents and other hazardous drugs. Recent Publications, Guidelines, Review Articles and Surveys. NIOSH, CDC. Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/pubs.html>.
76. King J., Alexander M., Byrne J. et al. A review of the evidence for occupational exposure risk to novel anticancer agents – a focus on monoclonal antibodies. *J Oncol Pharm Pract* 2016;22(1):121–34.
77. McGowan D. Safe handling and administration of MABS: the guidance. *Br J Nurs* 2015;24(16 Suppl 1):14–20.
78. Davis J., McLauchlan R., Connor T.H. Exposure to hazardous in healthcare: an issue that will not go away. *J Oncol Pharm Pract* 2011;17(1):9–13.
79. Тюляндин С.А., Самойленко И.В., Измерова Н.И. и др. Руководство для медицинского персонала по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами. М.: НИИ медицины труда РАМН, 2012. 58 с. [Tyulyandin S.A., Samoylenko I.V., Izmerova N.I. et al. A guidance for medical personnel on the safe management of antitumor drugs. Moscow: NII meditsiny truda RAMN, 2012. 58 p. (In Russ.)].
80. Preventing occupational exposure to cytotoxic and other hazardous drugs. European policy recommendation. Available at: www.europeanbiosafety-network.eu/wp-content/uploads/2016/05/Exposure-to-Cytotoxic-Drugs_Recommendations_DINA4_10-03-16.pdf.
81. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда. Р 2.2.2006-05. [Guidance on hygienic assessment of working environment factors and the work process. Criteria and classification of working conditions. R 2.2.2006-05. (In Russ.)].

Метаболические аспекты адоптивной иммунотерапии опухолей

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

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

В широком ряду методов лечения онкологических заболеваний особое место принадлежит иммунотерапии — терапевтическому подходу, использующему возможности иммунной системы организма в поддержании генетического постоянства его клеток и тканей. Иммунотерапия нацелена на то, чтобы вызывать разрушение опухолевых клеток Т-лимфоцитами, чьи рецепторы способны распознать пептиды мутантных белков, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости. В клинической практике Т-лимфоциты способны вызывать стойкое улучшение и даже полное излечение больных, опухоли которых устойчивы к другим доступным методам лечения. Ряд работ, появившихся в последние годы, указывают на то, что эффективность такой терапии в значительной степени зависит от процессов энергетического метаболизма Т-лимфоцитов. Существуют несколько подходов, способных модулировать метаболизм Т-лимфоцитов и достичь оптимального проявления их противоопухолевых свойств.

Ключевые слова: противоопухолевый иммунитет, гликолиз, Т-клеточный рецептор, иммунологическая память, иммунометаболизм

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-21-26

Metabolic aspects of adoptive immunotherapy of tumors

D.B. Kazanskiy, Yu. Yu. Silaeva, A.A. Kalinina, M.A. Zamkova, L.M. Khromykh, N.A. Persiyantseva, L.Kh. Dzholokhava

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

In wide number of approaches to treatment of cancer immunotherapy plays special role. This approach exploits capabilities of immune system to support genetic constancy of different cells and tissues of the organism. Immunotherapy is designed to induce tumor cell destruction by T-lymphocytes whose receptors can recognize peptides of mutant proteins complexed with the molecules of the major histocompatibility complex. In clinical practice T-lymphocytes can result in sustained and complete responses in patients whose cancers were resistant to available treatment options. Recent evidences suggest that efficiency of such therapy generally depends on metabolic properties of T-lymphocytes. A number of approaches allows modulate T-cell metabolism providing strategies to optimize activity of anti-tumor T-lymphocytes.

Key words: anti-tumor immunity, glycolysis, T-cell receptor, immunological memory, immunometabolism

Прогрессирование рака от локализованной опухоли к метастатической болезни ассоциировано со снижением сроков выживаемости и эффективности дальнейшего лечения пациентов [1]. Терапевтические подходы, успешные при метастатических солидных опухолях, ограничены, и заболевание продолжает прогрессировать [2, 3]. В таких случаях иммунотерапия может быть использована как метод лечения онкологических пациентов. Она осуществляется посредством адоптивного переноса (переноса иммунитета вместе с лимфоидными клетками донора) Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), или Т-лимфоцитов, модифицированных генно-инженерными методами с использованием ингибиторов иммунологической толерантности, способных усилить функции Т-клеток [4–6].

Теоретические предпосылки, обосновывающие перспективность применения иммунотерапии в борьбе со злокачественными новообразованиями, описаны нами в ряде более ранних обзоров [7–9]. Трансдукцию Т-лимфоцитов пациента осуществляют генетическими конструкциями, кодирующими компоненты Т-клеточного рецептора (TCR) или других молекул (химерные антигенные рецепторы (CAR)), способных специфически распознать антигены на поверхности опухолевой клетки [7].

Иммунотерапия при раке успешно используется, приводит к полному и продолжительному клиническому ответу на лечение у пациентов с некоторыми видами онкологических заболеваний, в том числе с меланомой и острым лимфобластным лейкозом [10–12], и в настоящее время исследуется как метод лечения

ряда других типов опухолей [13]. Результаты недавних исследований выявили некоторые из механизмов, посредством которых Т-клетки элиминируют диссеминированные клетки опухоли, и показали, что статус дифференцировки и метаболические свойства Т-клеток играют важную роль в регуляции их противоопухолевых функций [14].

Контекстом, на котором основано наше современное понимание роли метаболизма в регуляции противоопухолевого иммунитета, является серия исследований дифференцировки Т-лимфоцитов CD8⁺. Т-клетки CD8⁺ можно подразделить на популяции: наивные клетки (T_N), стволовые клетки памяти (T_{SCM}), центральные клетки памяти (T_{CM}), эффекторные клетки памяти (T_{EM}) и терминально дифференцированные эффекторные клетки (T_{EFF}) [15]. Установлено, что разные субпопуляции Т-клеток имеют различные метаболические профили, которые регулируют их функцию [16, 17]. Вместе с тем существует негативная корреляция степени дифференцировки клеток с их способностью к проявлению противоопухолевых функций [18]. У пациентов, подвергшихся терапии TIL, увеличенная длина теломера, и экспрессия CD27 во введенных Т-клетках коррелируют с лучшей способностью устранять опухоль [19]. В соответствии с этим адаптивный перенос полностью дифференцированных терминальных эффекторов T_{EFF} обнаружил меньшую эффективность, чем использование менее дифференцированных стволовых или центральных клеток памяти на мышиных моделях васкуляризованной меланомы [20, 21]. Результаты этих исследований наводят на мысль, что приобретение полностью дифференцированного терминального эффекторного фенотипа ограничивает *in vivo* распространение и жизнеспособность Т-клеток после адаптивного переноса, что, в свою очередь, ограничивает их противоопухолевые ответы. Напротив, клетки с увеличенным потенциалом самообновления, по всей видимости, имеют повышенную терапевтическую эффективность [20, 22].

Как показывают исследования гемопоэтических клеток и клеток памяти, клеточные метаболические процессы регулируют способность клеток к самообновлению [23–25]. У гемопоэтических стволовых клеток увеличенная метаболическая активность может быть прямо вовлечена в отсутствие состояния покоя через генерацию высоких уровней активных форм кислорода (ROS), которые способны улучшать свойства долговременного самообновления [26–28]. Сходным образом усиленный метаболизм митохондрий и продукция ROS, вызванные Т-клеточной активацией, необходимы для эффекторной функции и пролиферации [29, 30], но могут также ослаблять долговременную способность субпопуляций клеток памяти (T_{SCM} и T_{CM}) к самообновлению.

В этой работе мы концентрируем внимание на условиях функционирования Т-клеток, используемых в иммунотерапии, конкуренции Т-лимфоцитов

и опухоли за питательные вещества, метаболических регуляторах в микроокружении опухоли и метаболических свойствах Т-клеток, которые успешно элиминируют опухоли. В частности, следует особо подчеркнуть важность сигнального пути через mTOR в самообновлении [31–33] и состоянии покоя [34], дифференцировки в эффекторы и клетки памяти [35, 36], уровней ROS [23, 37] и противоопухолевой активности [38]. Поскольку дифференцировка клеток связана с их метаболической активностью [39], существует возможность впервые охарактеризовать метаболические свойства Т-клеток, которые ассоциированы с усиленной противоопухолевой активностью, и перепрограммировать метаболические пути таким образом, чтобы оптимизировать клиническую эффективность методов лечения, основанных на использовании Т-лимфоцитов.

Жизненный цикл Т-лимфоцитов, используемых в иммунотерапии опухолей, состоит из нескольких фаз, в ходе которых они имеют различные функциональные и метаболические потребности. Опухольеспецифические Т-лимфоциты нужно успешно выделить из опухоли пациента и затем культивировать *in vitro*, чтобы получить большое количество клеток [19]. После переноса пациенту они должны прижиться, обнаружить опухоль, выжить в неблагоприятном микроокружении, противодействуя ему, и в конечном счете осуществить массивную атаку на опухолевые клетки. Эффективность этого процесса зависит от пролиферации и продукции воспалительных цитокинов и молекул, которые запускают лизис опухолевых клеток. На каждой стадии этого процесса Т-клетки должны сохранять баланс метаболических требований для поддержания энергетики, жизнеспособности и персистенции с необходимостью быстрой пролиферации и реализации воспалительной функции. Поддержание этого баланса требует использования разных метаболических программ [39]. Результаты проведенных исследований показали, что аэробный гликолиз необходим Т-клеткам для того, чтобы они могли достичь полной воспалительной функциональности [40–42], тогда как длительно персистирующие Т-клетки с фенотипом клеток памяти обычно используют программу окислительного метаболизма, характеризующуюся усиленным окислением жирных кислот в митохондриях, и резервные респираторные способности (spare respiratory capacity, SRC) [16, 43]. Эти метаболические программы могут определять не только функцию, но и судьбу Т-клеток. Последние с усиленным гликолизом могут становиться терминально дифференцированными [44], и навязывание им окислительной метаболической программы может привести к их старению и утрате эффекторной функции [45].

Таким образом, метаболические требования для успешной иммунотерапии Т-лимфоцитами являются динамическими и требуют наличия механизмов как для долговременного поддержания жизнеспособ-

ности (клетки в состоянии покоя, метаболизирующие жирные кислоты), так и для намного более энергозатратной эффекторной функции, для которой характерны высокие уровни гликолиза и окислительного фосфорилирования. Последние работы проливают свет на то, как метаболические программы Т-клеток могут быть использованы в целях усиления противоопухолевого иммунного ответа.

Эффекторные Т-клетки нуждаются в метаболической программе аэробного гликолиза, чтобы пролиферировать и секретировать эффекторные цитокины, подобные интерферону (IFN- γ) [46, 47], однако использование ими гликолитического метаболизма в ходе примирования (иммунизации или сенсibilизации) *in vitro* и экспансии Т-клеток может приводить к редуцированной функциональной активности *in vivo*. Блокада метаболизма глюкозы при использовании ингибитора гексокиназы 2-дезоксиглюкозы [44] или подавление активности Akt [48] в ходе примирования *in vitro* ограничивает дифференцировку Т-клеток. Эти метаболические манипуляции приводят к более выраженной противоопухолевой активности и усиливают метаболическую работоспособность Т-клеток в мышечной модели васкуляризованной меланомы B16F10. Хотя причины этого не ясны, увеличенные показатели SRC митохондрий также наблюдаются при этих терапевтических воздействиях. Подавление метаболизма холестерина аналогично может усиливать противоопухолевую активность [49]. Недавняя работа с Т-клетками с CAR показала, что уровень окислительного метаболизма связан со способностью клеток к персистенции и с продолжительностью их жизни в организме [50]. Т-клетки с увеличенным мембранным потенциалом митохондрий и уровнем ROS имеют сниженную противоопухолевую активность [23]. Интересно, что Т-клетки с низким мембранным потенциалом митохондрий в ходе примирования *in vitro* имеют фенотипы, характерные для формирующихся клеток памяти, такие как высокие показатели SRC и экспрессия генов клеток памяти, а также хорошая способность к персистенции по сравнению с клетками с высоким потенциалом на мембране митохондрий. Напротив, клетки с высоким потенциалом на мембране митохондрий являются более гликолитическими, экспрессируют гены эффекторов и имеют усиленную функциональность *in vitro*. Вероятно, что увеличенные уровни ROS, наблюдаемые в клетках с высоким мембранным потенциалом митохондрий, вредны для долговременного выживания Т-лимфоцитов [23]. Степень метаболической активности Т-клеток может регулироваться динамикой митохондрий в клетке, слияние митохондрий усиливает продолжительность жизни клетки и противоопухолевый ответ, тогда как деление митохондрий запускает терминальную дифференцировку эффекторов [51]. Повышенная метаболическая активность в ходе экспансии *ex vivo* может приводить Т-клетки к состоянию, в котором они имеют низкую способность к персистенции *in vivo* и, следовательно,

к слабому противоопухолевому ответу. Результаты недавнего исследования показали, что добавление аргинина в культуральную среду в ходе экспансии *ex vivo* способно усилить окислительный и подавить гликолитический метаболизм, что позволяет добиться получения большого количества более эффективных противоопухолевых клеток [52]. Таким образом, условия культивирования, в которых метаболическая активность противоопухолевых Т-клеток ограничивается в ходе экспансии *ex vivo*, могут приводить к продукции клеток с характеристиками, способствующими их использованию в иммунотерапии.

Как только Т-лимфоциты были перенесены *in vivo* и прошли путь к сайту локализации опухоли, для эффективности в противоопухолевом ответе им нужно использовать намного более активный метаболический фенотип [44, 53]. Усиление гликолиза через генетическое или фармакологическое усиление активности гипоксия-индуцибельного фактора (HIF), такое как мутация или нокаут в гене *VHL* [54] или пролилгидроксилаз (PHD) [55], приводит к повышению противоопухолевой активности. К тому же гликолитический метаболизм может прямо поддерживать генерацию воспалительных цитокинов, которые необходимы для эпигенетического поддержания противоопухолевой активности [46]. Ассоциация высокого мембранного потенциала митохондрий с продукцией цитокинов Т-клетками [23] может указывать на то, что для контролирования роста опухоли требуется устойчивая активность митохондрий в Т-клетках в сайте расположения опухоли. Напротив, появление PD1 в сайте локализации опухоли [45] или избыток калия, происходящего из опухоли, могут ингибировать функциональность противоопухолевых Т-лимфоцитов [56]. Результаты 2 недавних исследований показали, что утрата метаболической активности через Akt-опосредованное подавление коактиватора PPAR-g 1a (PGC-1a) редуцирует эффекторную функцию и приводит к слабой противоопухолевой активности Т-клеток [57, 58]. Повышенная экспрессия PGC-1a в Т-клетках, как было показано, восстанавливает противоопухолевую активность, что наводит на мысль о том, что репрограммирование биогенеза митохондрий Т-клеток могло бы представлять альтернативную стратегию восстановления функций TIL при лечении рака. Напротив, в недавно опубликованной работе продемонстрировано, что окисление жирных кислот в митохондриях не является необходимым для формирования Т-клеток памяти и их функционирования. Непрерывный гликолиз, вызванный кондиционным нокаутом супрессорного гена *VHL*, продукт которого усиливает активность HIF, поддерживает усиленную персистенцию Т-клеток [59]. Эти наблюдения противоречат той точке зрения, что клетки памяти имеют низкие уровни гликолиза и могут указывать на комплексность сигналинга через HIF [60, 61].

Конкуренция Т-клеток и опухоли — метаболический регулятор в микроокружении опухоли. Очевидно, что опухоли не являются гомогенной массой злокачественно трансформированных клеток, а скорее сложными структурами, содержащими сосудистые и стромальные клетки, которые составляют опухоль наряду с разнообразными инфильтрирующими иммунными клетками, включая лимфоциты и клетки миелоидного роста [19, 62]. Таким образом, успех в Т-клеточной иммунотерапии рака достигается не только адекватным трафиком Т-клеток внутрь опухолевого узла, но может также в значительной степени определяться тем, насколько успешно Т-лимфоциты конкурируют за питательные вещества в иммуносупрессивном окружении. Эффекторные Т-клетки, по-видимому, конкурируют с опухолевыми клетками за глюкозу, которая делает их способными секретировать IFN- γ и отторгать опухоль. Депривация глюкозы подавляет TCR-зависимую мобилизацию ионов кальция и сигнальный путь, опосредованный NFAT, что ведет к подавлению ответов Т-клеток. Экспрессия лиганда PD-1 (PD-L1) опухолевыми клетками активирует сигнальный путь Акт/mTOR и гликолиз в опухолевой клетке [53, 62]. Антитела, которые блокируют взаимодействие PD-1 с PD-L1, могут восстановить содержание глюкозы в микроокружении опухоли, гликолиз в Т-лимфоцитах и продукцию ими IFN- γ . Результаты недавнего исследования показали, что клетки рака яичника ограничивают доступность глюкозы Т-лимфоцитам и ослабляют их эффекторную функцию [63]. Все вместе эти данные указывают на то, что доступность глюкозы внутри микроокружения опухоли регулирует функцию эффекторных Т-клеток.

Иммунотерапия, проводимая с использованием адоптивного переноса TIL, может привести к полной регрессии опухоли у некоторых пациентов с метастатической меланомой [19]. TIL являются гетерогенными в отношении к их состоянию дифференцировки, и получение большого числа аутологичных TIL для адоптивного переноса требует их размножения в культуре *in vitro*. Современные методы их получения активируют Акт и mTOR, приводя к терминальной дифференцировке Т-клеток. Ограничение активности Акт [48] и mTOR [33] в течение примирования или усиление активности STAT-3 [64] и сигнального пути через Wnt- β -катенин человеческих Т-клеток [21] может остановить развитие Т-клеток, поддерживая их в состоянии, схожем со стволовыми клетками памяти. Это заторможенное развитие эффекторных Т-клеток сопровождается усилением таких метаболических свойств, как редуцированный гликолиз и увеличенное

использование окисления жирных кислот, восстанавливая таким образом долговременную жизнеспособность и противоопухолевую активность человеческих Т-клеток.

Авторы обзора [65] предлагают модель иммунометаболизма противоопухолевых Т-клеток, в которой клетки с высокой метаболической активностью в ходе экспансии *in vitro* и примирования приобретают фенотип терминально дифференцированных клеток. Высокая метаболическая активность с одновременно повышенным мембранным потенциалом митохондрий и уровнем ROS ведет к короткоживущим клеткам со слабой противоопухолевой активностью. Напротив, клетки с ограниченной метаболической активностью *in vitro* сохраняются в функциональном состоянии, в котором имеют преимущество усиленное самообновление и персистенция, дающие возможность для длительного сохранения и улучшения противоопухолевой функции. Ключевым моментом этой модели является то, что ограничение метаболической активности Т-клеток в сайте локализации опухоли следует снимать, чтобы сделать возможной деструкцию опухоли.

Иммунометаболизм помогает понять биоэнергетические требования Т-клеточной дифференцировки, выбор Т-клетками своей судьбы и их функционирование. Современные методы получения Т-клеток для адоптивной иммунотерапии имеют «подводные камни», которые могут привести культивируемые клетки к терминальной дифференцировке и старению культур. Поэтому подходы, которые расширяют область наших знаний о метаболических требованиях оптимального функционирования противоопухолевых Т-клеток, требуют активной разработки в дальнейших исследованиях.

Очевидно, что применение термина «иммунометаболизм» имеет значение, далеко выходящее за рамки проблематики иммуноонкологии в силу того, что особенности дифференцировки Т-лимфоцитов оказывают глубокое воздействие на процессы регуляции иммунного ответа в целом. Предпочтительное развитие иммунного ответа по гуморальному или воспалительному типу может быть важным для усиления и ослабления иммунных функций в ответах на патогены с внеклеточной и внутриклеточной локализацией. Девиация иммунного ответа в сторону развития воспалительных функций у Т-лимфоцитов благоприятствует не только противоопухолевому иммунному ответу, но и ответам на таких возбудителей заболеваний, как лепра, туберкулез и другие внутриклеточные инфекции. Метаболические требования, которые предъявляют Т-лимфоциты в ответах на неопухолевые антигены, до сих пор остаются белым пятном в современной науке.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mehlen P., Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):449–58.
- Cardoso F., Di L.A., Lohrisch C. et al. Second and subsequent lines of chemotherapy for metastatic breast cancer: what did we learn in the last two decades? *Ann Oncol* 2002;13(2):197–207.
- Spaans J.N., Goss G.D. Drug resistance to molecular targeted therapy and its consequences for treatment decisions in non-small-cell lung cancer. *Front Oncol* 2014;4:190.
- Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015;348(6230):62–8.
- Robbins P.F., Morgan R.A., Feldman S.A. et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 2011;29(7):917–24.
- Sharma P., Allison J.P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015;348(6230):56–61.
- Kazansky D.B. Intrathymic selection: new insight into tumor immunology. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:133–44.
- Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология* 2012;5(2):85–95. [Kazanskiy D.B. T-lymphocytes in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2012;5(2):85–95. (In Russ.)].
- 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. Transplantational 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.)].
- Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A. et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T-cells. *Blood* 2012;119(12):2709–20.
- Grupp S.A., Kalos M., Barrett D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T-cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368(16):1509–18.
- Rosenberg S.A., Yang J.C., Sherry R.M. et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;17(13):4550–7.
- Tran E., Robbins P.F., Lu Y.C. et al. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer. *N Engl J Med* 2016;375(23):2255–62.
- Chang C.H., Pearce E.L. Emerging concepts of T-cell metabolism as a target of immunotherapy. *Nat Immunol* 2016;17(4):364–8.
- Gattinoni L., Lugli E., Ji Y. et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 2011;17(10):1290–7.
- Pearce E.L., Walsh M.C., Cejas P.J. et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* 2009;460(7251):103–7.
- Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R. et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T-cell subsets. *J Immunol* 2011;186(6):3299–303.
- Sukumar M., Gattinoni L. The short and sweet of T-cell therapy: restraining glycolysis enhances the formation of immunological memory and antitumor immune responses. *Oncoimmunology* 2016;3(1):e27573.
- Rosenberg S.A., Restifo N.P., Yang J.C. et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8(4):299–308.
- Klebanoff C.A., Gattinoni L., Torabi-Parizi P. et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T-cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T-cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(27):9571–76.
- Gattinoni L., Zhong X.S., Palmer D.C. et al. Wnt signaling arrests effector T-cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med* 2009;15(7):808–13.
- Muranski P., Boni A., Antony P.A. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008;112(2):362–73.
- Sukumar M., Liu J., Mehta G.U. et al. Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy. *Cell Metab* 2016;23(1):63–76.
- Luckey C.J., Bhattacharya D., Goldrath A.W. et al. Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(9):3304–9.
- Vannini N., Girotra M., Naveiras O. et al. Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nat Commun* 2016;7:13125.
- Bertolo A., Capossela S., Fränkl G. et al. Oxidative status predicts quality in human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2017;8(1):3.
- Tothova Z., Kollipara R., Huntly B.J. et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007;128(2):325–39.
- Ito K., Hirao A., Arai F. et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004;431(7011):997–1002.
- Sena L.A., Li S., Jairaman A. et al. Mitochondria are required for antigen-specific T-cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* 2013;38(2):225–36.
- Weinberg S.E., Sena L.A., Chandel N.S. et al. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity* 2015;42(3):406–17.
- Pollizzi K.N., Sun I.H., Patel C.H. et al. Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8+ T-cell differentiation. *Nat Immunol* 2016;17(6):704–11.
- Verbist K.C., Guy C.S., Milasta S. et al. Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* 2016;532(7599):389–93.
- Scholz G., Jandus C., Zhang L. et al. Modulation of mTOR signalling triggers the formation of stem cell-like memory T-cells. *EBioMedicine* 2016;4:50–61.
- Yang K., Neale G., Green D.R. et al. The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T-cells to promote immune homeostasis and function. *Nat Immunol* 2011;12(9):888–97.
- Araki K., Turner A.P., Shaffer V.O. et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 2009;460(7251):108–12.
- Pollizzi K.N., Patel C.H., Sun I.H. et al. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8+ T-cell differentiation. *J Clin Invest* 2015;125(5):2090–108.
- Shrestha S., Yang K., Wei J. et al. Tsc1 promotes the differentiation of memory CD8+ T-cells via orchestrating the transcriptional and metabolic programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(41):14858–63.
- Rao R.R., Li Q., Odunsi K., Shrikant P.A. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T-cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 2010;32(1):67–78.
- O'Neill L.A., Kishton R.J., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016;16(9):553–65.
- Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G. et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T-cell activation and effector function. *Cell Metab* 2014;20(1):61–72.

41. Gerriets V.A., Kishton R.J., Nichols A.G. et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4+ T-cell subsets and inflammation. *J Clin Invest* 2015;125(1):194–207.
42. Wang R., Dillon C.P., Shi L.Z. et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 2011;35(6):871–82.
43. van der Windt G.J., Everts B., Chang C.H. et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T-cell memory development. *Immunity* 2012;36(1):68–78.
44. Sukumar M., Liu J., Ji Y. et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T-cell memory and antitumor function. *J Clin Invest* 2013;123(10):4479–88.
45. Patsoukis N., Bardhan K., Chatterjee P. et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* 2015;6:6692.
46. Peng M., Yin N., Chhangawala S. et al. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science* 2016;354(6311):481–4.
47. Chang C.H., Curtis J.D., Maggi L.B. Jr et al. Posttranscriptional control of T-cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013;153(6):1239–51.
48. Crompton J.G., Sukumar M., Roychoudhuri R. et al. Akt inhibition enhances expansion of potent tumor-specific lymphocytes with memory cell characteristics. *Cancer Res* 2015;75(2):296–305.
49. Yang W., Bai Y., Xiong Y. et al. Potentiating the antitumor response of CD8+ T-cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature* 2016;531(7596):651–5.
50. Kawalekar O.U., O'Connor R.S., Fraietta J.A. et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T-cells. *Immunity* 2016;44(2):380–90.
51. Buck M.D., O'Sullivan D., Klein Geltink R.I. et al. Mitochondrial dynamics controls T-cell fate through metabolic programming. *Cell* 2016;166(1):63–76.
52. Geiger R., Rieckmann J.C., Wolf T. et al. L-arginine modulates T-cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell* 2016;167(3):829–42.
53. Ho P.C., Bihuniak J.D., Macintyre A.N. et al. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T-cell responses. *Cell* 2015;162(6):1217–28.
54. Doedens A.L., Phan A.T., Stradner M.H. et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8+ T-cells to persistent antigen. *Nat Immunol* 2013;14(11):1173–82.
55. Clever D., Roychoudhuri R., Constantinides M.G. et al. Oxygen sensing by T-cells establishes an immunologically tolerant metastatic niche. *Cell* 2016;166(5):1117–31.
56. Eil R., Vodnala S.K., Clever D. et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T-cell effector function. *Nature* 2016;537(7621):539–43.
57. Bengsch B., Johnson A.L., Kurachi M. et al. Bioenergetic insufficiencies due to metabolic alterations regulated by the inhibitory receptor PD-1 are an early driver of CD8+ T-cell exhaustion. *Immunity* 2016;45(2):358–73.
58. Scharping N.E., Menk A.V., Moreci R.S. et al. The tumor microenvironment represses T-cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T-cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity* 2016;45(2):374–88.
59. Phan A.T., Doedens A.L., Palazon A. et al. Constitutive glycolytic metabolism supports CD8+ T-cell effector memory differentiation during viral infection. *Immunity* 2016;45(5):1024–7.
60. Piret J.P., Mottet D., Raes M., Michiels C. Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002;64(5–6):889–92.
61. Makino Y., Nakamura H., Ikeda E. et al. Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T-cells. *J Immunol* 2003;171(12): 6534–40.
62. Kerkar S.P., Restifo N.P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012;72(13):3125–30.
63. Zhao E., Maj T., Kryczek I. et al. Cancer mediates effector T-cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction. *Nat Immunol* 2016;17(1):95–103.
64. Cui W., Liu Y., Weinstein J.S. et al. An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T-cells. *Immunity* 2011;35(5):792–805.
65. Sukumar M., Kishton R.J., Restifo N.P. Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2017;46:14–22.

МикроРНК-155-5p в патогенезе онкологических заболеваний

И.Б. Зборовская, А.В. Комельков

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

Контакты: Ирина Борисовна Зборовская zborovskaya@mail.ru

К числу наиболее охарактеризованных и активно изучаемых микроРНК, регулирующих процессы, тесно связанные с канцерогенезом, в том числе клеточную дифференцировку, адгезию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, метастазирование, апоптоз и иммуносупрессию, относится miR-155. Кроме того, данная микроРНК вовлечена в дифференцировку гемопоэтических клеток, а также в развитие воспалительных реакций. Ассоциация между специфической дерегуляцией экспрессии miR-155 и канцерогенезом подтверждена целым рядом как фундаментальных, так и клинических исследований и обусловлена посттранскрипционной регуляцией важнейших генов онкоассоциированных сигнальных путей. Модуляция уровней экспрессии miR-155 связана с возникновением целого ряда лейкозов и лимфом, а также некоторых солидных опухолей. Повышение уровня клеточной и/или циркулирующей miR-155 при некоторых онкологических заболеваниях может служить маркером прогрессирования и лекарственной устойчивости. Кроме того, ингибирование экспрессии miR-155 может оказаться перспективным методом разработки новых подходов к противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: онкогенез, микроРНК, miR-155, онкомаркер, лейкоз, лимфома, солидная опухоль, экзосома, иммуносупрессия, химиорезистентность

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-27-36

MicroRNA-155-5p in pathogenesis of cancer

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

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

MicroRNA miR-155 is one of the most characterized and actively studied microRNAs that regulate processes closely related to carcinogenesis, including cell differentiation, adhesion, migration and invasion of the tumor cells, metastasis, apoptosis and immunosuppression. In addition, this miRNA is involved in differentiation of hematopoietic cells and developing of inflammation. The association between specific deregulation of the expression of miR-155 and carcinogenesis is confirmed by a number of both fundamental and clinical studies and is due to the posttranscriptional regulation of the most important genes of the tumor associated pathways. Modulation of the levels of expression of miR-155 is associated with the emergence of a number of leukemias and lymphomas, as well as some solid tumors. An increase of the level of cellular and/or circulating miR-155 in some cancers can serve as a marker for progression and drug resistance. In addition, inhibition of the expression of miR-155 can be a promising method for developing new approaches in antitumor therapy.

Key words: oncogenesis, microRNA, miR-155, oncomarker, leukemia, lymphoma, solid tumor, exosome, immunosuppression, chemoresistance

Введение

МикроРНК – класс малых (18–25 нуклеотидов) РНК, регулирующих экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Число работ, посвященных исследованиям микроРНК при различных заболеваниях человека, особенно онкологических, неуклонно растет. Однако, несмотря на усилия в изучении механизмов действия различных микроРНК, их прямого или опосредованного участия в модулировании клеточных сигнальных путей и определения роли в процессах опухолевого роста, картина все более усложняется. Проблема заключается, в первую очередь, в том, что большинство микроРНК multifunctional, регулируют экспрессию сразу нескольких генов,

при том, что один и тот же ген может посттранскрипционно регулироваться сразу несколькими микроРНК. В разных клеточных типах и даже в пределах схожих клеточных контекстов одна и та же микроРНК выступает в роли то онкогена, то опухолевого супрессора [1, 2]. Эти утверждения прекрасно иллюстрирует работа исследователей из Онкологического центра Андерсона (Anderson Cancer Center, Texas) и Кембриджского университета (University of Cambridge, Кембридж), опубликованная в 2015 г. в журнале, аффилированном с Nature [3]. Авторы дали подробную и хорошо аргументированную характеристику отдельным микроРНК и их кластерам, ассоциированным с целым рядом клеточных процессов и сигнальных путей, и попытались

представить архисложную и запутанную картину их возможного взаимовлияния. Следует также отметить, что конкурентные взаимодействия разных микроРНК в отношении комплементарных целевых последовательностей в пределах конкретного гена практически не исследованы.

Под воздействием структурных и эпигенетических нарушений генов, в том числе в локусах, кодирующих микроРНК, а также изменений других регуляторов биологических процессов, в частности факторов роста, гормонов, ферментов и т. д., происходит перепрограммирование сигнальных путей, что, безусловно, может влиять и на эффекты воздействия микроРНК на таргетные РНК. Кроме того, в процессе опухолевой трансформации наблюдаются нарушения в процессинге самих микроРНК [4]. Имеет значение способ межклеточной миграции микроРНК как свободно циркулирующих, так и входящих в состав микровезикул. Механизмы формирования содержимого и доставки экзосом, содержащих микроРНК, в соседние и отдаленные клетки исследуются очень активно [5–7], однако далеки от полного понимания. Тем не менее знания накапливаются, углубляются, структурируются, и на сегодняшний день они позволяют анализировать основные аспекты действия как отдельных микроРНК, так и их сочетаний при самых различных онкологических заболеваниях, а также на разных этапах опухолевого процесса, и использовать их в качестве онкомаркеров.

По последней версии Mirbase (<http://www.mirbase.org>, август 2017 г.), у человека зафиксировано существование 1881 микроРНК (miRs), из которых по меньшей мере половина так или иначе ассоциирована с онкогенезом. Несмотря на огромное количество экспериментальных и клинических результатов, касающихся изучения больших панелей микроРНК и их отдельных представителей, 2 онкомикроРНК – miR-21 и miR-155 – встречаются наиболее часто, а изменения (повышение) уровня их экспрессии как в опухолях, так и в биологических жидкостях, фиксируются практически при всех типах неоплазии. Повышенная экспрессия этих онкомикроРНК часто коррелирует с прогрессированием онкологических заболеваний и ответом на противоопухолевую терапию [2, 8, 9].

Цель работы – кратко представить современные данные о роли miR-155 в развитии солидных опухолей и гемобластозов, оценить ее значение в качестве диагностического, прогностического и предиктивного онкомаркера, а также мишени для противоопухолевой терапии.

Общие сведения о miR-155

Последовательность ДНК, кодирующая miR-155, достаточно консервативна и обнаруживается не только у человека, но у мышей, птиц и даже вирусов (рис. 1). Исторически эта микроРНК идентифицирована в составе интегрированного кластера в В-клетках кур (bic),

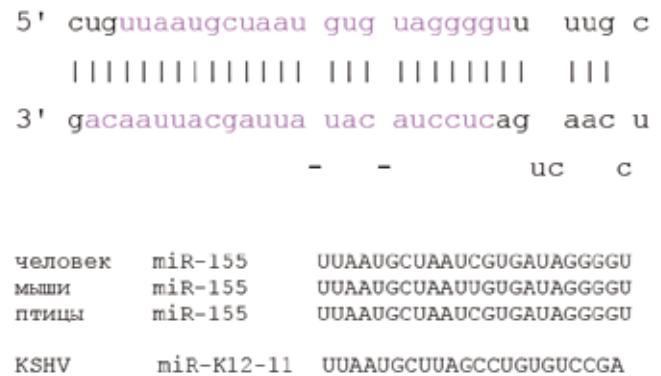


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность miR-155 (KSHV – Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) (адаптировано из [10])

активируемого вставкой вирусного промотора и ассоциированного с развитием птичьего лейкоза [10]. Первые данные об онкогенной природе miR-155 также получены при изучении механизмов развития диффузной В-крупноклеточной лимфомы [9]. У человека кластер *BIC*, ныне обозначаемый как *MIR155HG* (*MIR155 host gene*), локализован на хромосоме 21 (21p21.2-chr21:25573994–25574044). Нуклеотидные последовательности miR-155-5p и -3p представлены на рис. 1.

На сегодняшний день очевидно, что miR-155-5p играет существенную роль в патогенезе воспалительных, иммунологических реакций, онкологических, кардиоваскулярных и некоторых инфекционных заболеваний, а также манифестации синдрома Дауна и некоторых метаболических синдромов [10–12].

Роль miR-155 в регуляции генов и сигнальных путей

Благодаря биохимическим, молекулярно-биологическим и биоинформатическим исследованиям идентифицировано большое количество субстратов для широкого спектра различных микроРНК. Список известных на настоящий момент прямых мишеней miR-155-5p (далее miR-155) включает более 140 генов, участвующих во многих сигнальных путях. Фирмы – производители чипов для идентификации нарушений экспрессии генов-мишеней микроРНК предлагают панели (табл. 1), включающие от 40 до 90 генов, напрямую регулируемых miR-155 (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-6002Z.html).

Среди них обнаружен целый ряд генов, строго ассоциированных с процессами клеточной дифференцировки, трансформации, механизмами опухолевого роста и прогрессирования онкологических заболеваний, в частности *APC*, *KRAS*, *Rb1*, *TS1*, *MYB*, *RHOA*, *SKI*, *SOCS1*, *SPI1*, *FOXO3*, гены семейства *SMAD* и др. [3, 8, 13]. Особого внимания заслуживает тот факт, что гены репарации ДНК *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, нарушения функционирования которых связано с риском развития целого ряда злокачественных опухолей, в первую очередь рака толстой кишки, регулируются именно miR-155 [8, 14]. Принимая во внимание факт не-

Таблица 1. Панель генов, входящих в состав чипов для идентификации нарушений экспрессии генов-мишеней miR-155

Мишени miR-155, верифицированные экспериментально	Теоретически рассчитанные мишени miR-155
AGTR1, APC, ARID2, BACH1, CEBPB, CYR61, DET1, EDN1, ETS1, FADD, FGF7, FOXO3, HIVEP2, IFNGR1, IKBKE, INPP5D, IRAK3, JARID2, LDOC1, MAFB, MATR3, MECP2, MEIS1, MLH1, MSH2, MSH6, MYB, MYO10, NFATC2IP, PELI1, JADE1, RHOA, RIPK1, RUNX2, SKI, SMAD1, SMAD2, SMAD5, SOCS1, SPI1, TAB2, TM6SF1, TP53INP1, TSHZ3, ZIC3, ZNF652	AAK1, AICDA, ASTN2, BCORL1, CARD11, CHD9, CSNK1G2, DET1, DHX40, DYNC111, G3BP2, GDF6, H3F3A, HNRNPA3, ILF3, KAT2A, KRAS, LPAR6, MEF2A, NDFIP1, NOVA1, PAM, PLD5, RAP1B, RREB1, SEC14L5, SEPT11, SKIV2L2, SOX1, STX16, STXBP5L, TCEB1, TLE4, TLE4, TOMM20, TTL, UOCR11, USP14, ZMYM2, ZNF236

посредственного взаимодействия данной микроРНК с транскриптами ключевых генов, miR-155 определяет функционирование сигнальных путей SAPK/JNK, ERK/MAPK, PI3K/AKT, TLR, ATM, TGF β , метаболизм глутатиона, клеточный цикл, активацию ряда IRF (interferon regulatory factor), многих рецепторов и т. д. [13, 15]. К тому же miR-155 участвует в изменении структуры хроматина посредством супрессии гистондеацетилазы 4 (HDAC4) или SMARCA4 – каталитической субъединицы хроматинремоделирующего комплекса SWI/SNF [16].

Следует отметить, что экспрессия самой микроРНК-155 регулируется NF- κ B, AP-1 (activator protein 1) и TLR2 [11, 17], а также BRCA1 [13, 18].

Интересно, что ядерный белок MCRS1 (microspherule protein 1-p78), регулирующий транскрипцию и недавно идентифицированный как возможный онкоген, влияет на трансформацию, миграцию и старение клеток (senescence). Он регулирует экспрессию целого ряда важнейших онкоспецифических генов – *Rb1*, *TP53*, *MYC*, *E2F2*, *PCNA*, *Ki67*, контролируя тем самым клеточную пролиферацию и рост опухоли. Однако прямого взаимодействия MCRS1 с этими генами не обнаружено. Китайские исследователи подтвердили, что *Rb1* – важнейший ген-супрессор опухолевого роста (TSG) – является прямой мишенью miR-155, а ее экспрессия в свою очередь регулируется именно MCRS1 [19]. Авторы предложили гипотезу, согласно которой синергизм действия онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста обеспечивают одни и те же микроРНК, т. е. происходит передача сигнала: онкоген \rightarrow miR \rightarrow TSG, например MCRS1 \rightarrow miR-155 \rightarrow *Rb1*, действующая в дозозависимом режиме. Факт существования такой связи с приоритетной ролью онкогена пока доказан для miR-155 и *Rb1*, но, на наш взгляд, для других онкогенов, микроРНК- и TSG-зависимость может быть и противоположной.

В контексте клеточного старения следует отметить, что при усилении экспрессии miR-155 не происходит укорочения теломер. Этот факт напрямую с экспрессией этой микроРНК, возможно, не связан, скорее всего именно потому, что гены MCRS негативно контролируют не только miR-155, но и активность теломеразы (TERT) [20].

Иммунологические реакции и miR-155

Одним из мощных факторов развития неоплазии являются нарушения функционирования иммунной

системы, которые также сопровождаются либо пониженной, либо повышенной экспрессией miR-155 [8, 10–12, 21]. Иногда ее позиционируют в качестве одного из основных регуляторов иммунитета [22], что, на наш взгляд, несколько преувеличено. Тем не менее очевидно, что согласно результатам многочисленных исследований в процессе воспалительных реакций экспрессия miR-155 значительно изменяется в Т- и В-лимфоцитах, макрофагах и моноцитах [13, 15], а также может модулировать функционирование NK-/Т-клеток [23, 24]. Следует отметить, что miR-663, еще одна многофункциональная микроРНК, контролирующая функционирование клеток иммунной системы, негативно регулирует экспрессию miR-155 [25].

Действие miR-155 в угнетении иммунитета в большой степени зависит от ее связывания с транскриптами генов, обеспечивающих функционирование TLR (toll-like receptor), липополисахаридов, интерлейкинов и интерферонов, а также генов, кодирующих антивоспалительные факторы, в частности SOCS и SHIP (SH2-domain containing inositol-50-phosphatase, SH2-доменсодержащая инозитол-5'-фосфатаза 1) [10, 12]. Сигнальный путь JAK/STAT/SOCS (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription/suppressor of cytokine signaling) во многом определяет функционирование иммунных клеток [26]. Многие из участников этого пути являются прямыми мишенями miR-155. Показано, что у человека изменение пути TLR2 \rightarrow miR-155 \rightarrow SOCS1 связано с формированием иммунного ответа с участием мононуклеарных клеток периферической крови [8]. У больных туберкулезом белок ESAT-6 (early secreted antigenic target 6-kDa protein), продуцируемый *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) снижает иммунореактивность, воздействуя на данный путь, что приводит к усилению апоптоза макрофагов [27].

Существует и другая версия активации TLR [28]. Известно, что мишенью положительной посттранскрипционной регуляции с помощью miR-155 является фактор некроза опухолей α (TNF- α). Предполагают, что miR-155 увеличивает либо трансляцию TNF- α -транскриптов, либо их стабильность [8]. В макрофагах экспрессия miR-155 строго ассоциирована с липополисахаридами (LPS) и интерферонами 1-го типа [10]. Оказалось, что гликопротеин внеклеточного матрикса костномозговых ниш тенасцин С (tenascin-C) может модулировать эти взаимодействия и играет одну из ключевых ролей в воспалении как ранний

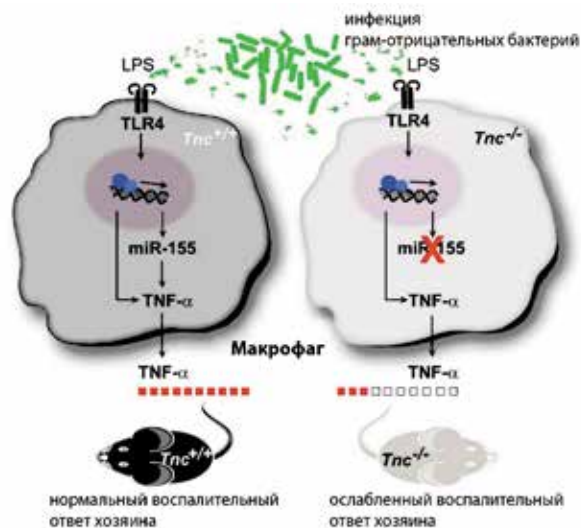


Рис. 2. Участие тенасцина в регуляции патогенных сигналов воспаления, ассоциированных с TLR4-сигналингом. LPS – липополисахарид; TLR – toll-like receptor; TNF – фактор некроза опухолей (адаптировано из [28])

фактор активации TLR4-сигналинга и супрессии противовоспалительных цитокинов. Его экспрессия необходима для эффективного иммунного ответа на бак-

териальные LPS, активирующие TLR4 и модулирующие трансляцию TNF- α , положительно регулируемую miR-155. Тенасцин принимает участие в функционировании олигодендроцитов, моноцитов/макрофагов, а также эндотелиальных клеток и миоцитов. Обнаружено, что тенасцин специфически индуцируется в макрофагах и миелоцитах при патогенной инфекции и/или повреждении тканей, а также при развитии опухолевых процессов, и в свою очередь индуцирует продукцию miR-155 (рис. 2) [28, 29].

Группой исследователей из США, Франции и Италии опубликована целая серия экспериментальных работ и обзоров, посвященных участию miR-155 в регуляции иммунных реакций в норме и при патологии [8, 21, 24, 30, 31]. Одна из последних работ этой группы посвящена исследованию прямой мишени miR-155 – гену-супрессору опухолевого роста *QKI* (*Quaking*), который, как показано авторами статьи, играет важную роль в иммунном ответе и развитии лейкозов. *QKI* влияет на созревание дендритных клеток и их взаимодействие с клетками-киллерами, дифференцировку Т-хелперов, экспрессию ряда интерлейкинов, функционирование липополисахаридов и их рецепторов, изменения кле-

Таблица 2. Пути передачи сигналов с участием miR-155 в некоторых клетках, определяющих иммунологические реакции

Клетка	Рецептор или лиганд	Действие
В	BCR/анти-IgM-F(ab') ₂	Активация ERK →
		Клеточная пролиферация →
	BCR + Fc γ RIIB/анти-IgM	Активация ERK ↑
		Клеточная пролиферация ↑
		Ca ²⁺ ↑
Макрофаги	LPS	TNF- α ↑, G-CSF ↑, SHIP1 ↑
DCs	LPS	TNF- α ↑, IL-6 ↑, IL-12 ↑, IL-23 ↑
	LPS	IL-1 β ↑, каспаза 1 ↑
	R837	IFN- α/β ↑, TNF- α ↑
Th1	TCR	IFN- γ →
Th2	TCR	IL-4/5/13 ↑
Th17	TCR	IL-17 ↑
Tregs	IL-2	Активация STAT5 ↑
CD4 T	TGF- β + IL-6	Th17 ↑
	TGF- β + IL-6 + IL-1 β	Th17 →
CD8 T	TCR	IFN- γ ↑
		Активация Akt ↑
		Клеточная пролиферация ↑

Примечание. BCR – В-клеточный рецептор; DC – дендритная клетка; LPS – липополисахарид; TNF – фактор некроза опухолей; G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; SHIP1 – SH2-доменсодержащая инозитол-5'-фосфатаза 1; IL – интерлейкин; IFN – интерферон; Th – Т-хелпер; TCR – Т-клеточный рецептор; Treg – регуляторная Т-клетка; STAT – сигнальный белок и активатор транскрипции; TGF – трансформирующий ростовой фактор.

точного сигналинга в Т- и В-лимфоцитах, макрофагах и т.д. [32]. Авторы постулируют, что *QKI* является ключевым регулятором этих процессов именно благодаря регуляции с помощью miR-155 [30].

В табл. 2 приведены данные об изменении клеточных сигналов в иммунных клетках при изменении экспрессии miR-155, подробно описанные и суммированные в обзоре R. Mashima [10]. Кроме того, хочется отметить и обзор исследователей из США (Онкологический центр Андерсона), в котором обсуждается участие miR-155 и других ключевых микроРНК в иммунном ответе, в том числе при онкологических заболеваниях [12].

Преодоление септических реакций, особенно у онкологических больных, является актуальной клинической задачей. Поиск биологических маркеров сепсиса основан на исследовании молекулярных механизмов его развития. В связи с этим представляется весьма перспективным исследование паттернов микроРНК на разных стадиях сепсиса. Оказалось, что miR-155 входит в панель микроРНК, характерных для сепсиса [12, 28].

В недавно опубликованной работе [33] проведено сравнительное исследование большой панели циркулирующих микроРНК в плазме крови 53 здоровых доноров и 99 септических больных. Авторы полагают, что комбинированная экспрессия 5 микроРНК (miR-16, miR-29a, miR-146, miR-155 и miR-182) специфична для сепсиса ($p < 0,0001$) и играет значимую роль в его развитии, поскольку не определяется у оперированных больных при воспалительных реакциях другого характера. Показано также, что в Т-лимфоцитах больных с септическим шоком уровень miR-155 статистически достоверно превышает таковой у здоровых доноров. При введении таким пациентам глюкокортикоидов, в частности дексаметазона, уровень экспрессии miR-155 снижается в дозозависимом режиме, и пролиферация Т-лимфоцитов значимо усиливается. Тот же эффект наблюдается при трансфекции в культуру лимфоцитов олигонуклеотидов, несущих анти-miR-155-последовательность [34].

В последнее время появляется все больше данных об использовании в клинической практике растительных полифенолов, обладающих противовоспалительным и противоопухолевым действием. Среди них хочется отметить работы о влиянии ресвератрола (trans-3,4',5-trihydroxystilbene), воздействующего на сигнальный путь mTOR. Кроме того, он способен модулировать метаболизм микроРНК, в частности понижать экспрессию онкогенных miR-155 и miR-21 [21, 25]. В опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что ресвератрол, как и куркумин — другой природный полифенол — могут уменьшать секрецию провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 6 и 8 и TNF- α), одновременно усиливая продукцию противовоспалительных, снижать экспрессию адгезионных молекул (ICAM-1) и т.д., причем ряд данных эффектов опосредуется действием

miR-155 [31, 35]. Эти факты свидетельствуют в пользу использования miR-155 в качестве терапевтической мишени при сепсисе. Полагают, что природные полифенолы могут применяться в качестве дополнительных эффективных средств в лечении сепсиса.

Гемобластозы и miR-155

МикроРНК miR-155 — мультифункциональная молекула, вовлеченная как в нормальный, так и в патологический гемопоэз, причем в случае гематологических онкологических заболеваний она выступает то в качестве онкогена, то онкосупрессора. Это зависит от клеточного контекста и типа злокачественной патологии. Тем не менее увеличение экспрессии miR-155 относится к наиболее часто фиксируемым нарушениям при гематологических патологиях. Помимо диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), оно наблюдается при остром миелоидном (AML) и остром промиелолейкоцитарном (APML) лейкозах, остром лимфобластном лейкозе (ALL), хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL). При мантийно-клеточной лимфоме (MCL) и хроническом миелолейкозе (CMML), напротив, наблюдается снижение экспрессии miR-155 [9]. В последнем случае это может быть связано с транслокацией (9; 22) и образованием слитного белка BCR-ABL, индуцирующего угнетение экспрессии miR-155, которое коррелирует с уменьшением клеточной гибели и изменением уровня p27kip1 [36].

На рис. 3 представлена схема участия некоторых мишеней miR-155 в развитии гемобластозов.

В противоположность онкогенному обнаружено и опухолесупрессирующее действие miR-155 при некоторых формах острого миелоидного лейкоза (FLT3-wild type AML), что связано с индукцией клеточной дифференцировки и апоптозом, опосредованным активацией каспазы 3 [37]. Кроме того, упомянутая выше репрессия эндогенного SHIP1 посредством miR-155 активирует сигнальный путь PI3K/Akt, что, по некоторым данным, может приводить и к замедлению развития острого миелоидного лейкоза [38]. Ответ на вопрос о том, каковы причины таких разных результатов, должен быть дан в ходе дальнейших экспериментов.

В обзоре P. Ranganath приводятся данные и о других микроРНК, которые в значительной степени изменяют экспрессию при лейко- и лимфопролиферативных заболеваниях (miR-21, miR-15, miR-16-1, miR-126b, miR-17-92), но miR-155 занимает особое место [9]. Она влияет на развитие практически всех лимфом, за исключением мантийно-клеточной, и хотя молекулярные механизмы возникновения разных форм пока не совсем расшифрованы, они, очевидно, связаны с функционированием сигнальных путей, отвечающих за нормальный лимфогенез [39, 40], в частности, вышеупомянутый сигнальный путь JAK/STAT/SOCS [23, 26].

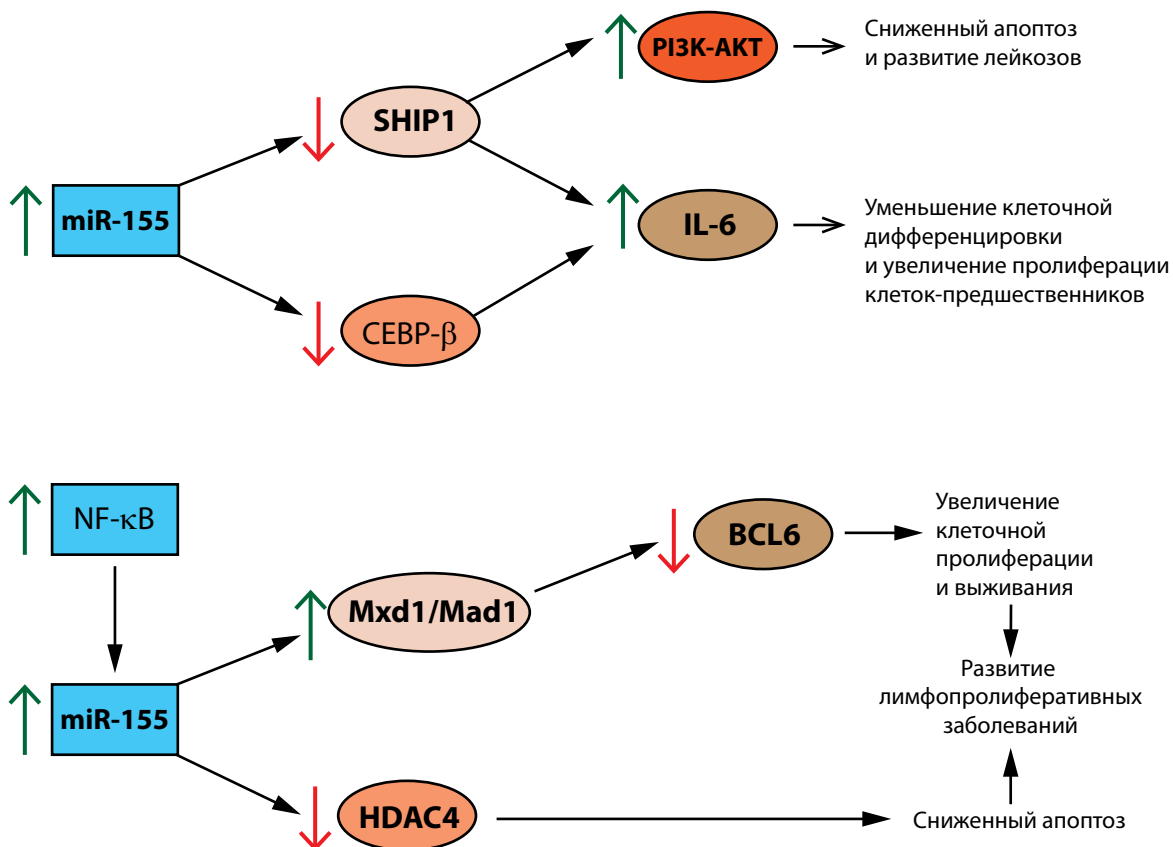


Рис. 3. Роль *miR-155* в развитии лейкозов и лимфом. Зеленые стрелки – повышенная активность, красные стрелки – пониженная активность. *SHIP1* – *SH2*-доменсодержащая инозитол-5'-фосфатаза 1; *CEBP-β* – *CCAAT enhancer-binding protein beta*; *IL* – интерлейкин; *HDAC4* – гистон-деацетилаза 4; *BCL* – *B-cell leukemia/lymphoma* (адаптировано из [9])

Нельзя не отметить, что ингибирование экспрессии *miR-155* в клетках лимфомы линии SNK-6 приводит к снижению пролиферации и усилению апоптоза, которое связывают с регуляцией экспрессии гена *FOXO3a* [23].

Солідные опухоли и *miR-155*

Наряду с другими микроРНК, *miR-155* входит в состав панелей, используемых для диагностики, прогноза и/или определения лекарственной устойчивости при многих онкологических заболеваниях [2, 13].

Ввиду того, что огромное количество работ, проведенных на разных моделях и коллекциях клинических образцов от пациентов с самыми различными онкологическими заболеваниями, демонстрируют заметные различия, группа китайских исследователей провела тщательный метаанализ данных, используя целый ряд информационных ресурсов [41]. Для анализа были отобраны 25 крупных исследований, включающих 1896 пациентов с различными онкологическими заболеваниями и 1226 здоровых доноров. Результаты свидетельствуют о диагностической значимости определения циркулирующей *miR-155* в сыворотке онкологических больных для европеоидной популяции (специфичность

составила 82,9 %), особенно в случае рака молочной железы (РМЖ). В азиатской популяции и при других типах неоплазий специфичность изменения экспрессии *miR-155* не так убедительна.

Как самостоятельный маркер *miR-155* используется не так часто, однако все исследователи отмечают перспективность определения данной микроРНК в качестве прогностического фактора при РМЖ, меланоме, гепатоцеллюлярной карциноме, глиомах, немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) и онкологических заболеваниях пищеварительного тракта [42–48]. Интересно, что уровень продукции участников пути *JAK/STAT/SOCS*, контролируемых *miR-155*, часто используется в качестве прогностических маркеров при раке толстой и прямой кишки [49].

Заслуживает внимание тот факт, что в отличие от онкогенной *miR-21*, являющейся маркером низких показателей как общей, так и безрецидивной выживаемости больных НМРЛ, при повышенном уровне экспрессии *miR-155* в клетках опухолей (преимущественно аденокарцином) показатели общей выживаемости значимо не меняются, однако появление рецидивов и метастазов наблюдается в более ранние послеоперационные сроки [42, 46, 50]. В июне 2017 г. опублико-

вано международное исследование, выполненное под руководством G.A. Calin из Онкологического центра Андерсона, в котором на экспериментальном и большом клиническом материале (956 пациентов с НМРЛ и лимфопролиферативными заболеваниями) продемонстрировано существование механизма отрицательной обратной связи miR-155 и TP53. Авторы показали, что комбинация повышенной экспрессии miR-155 и сниженной экспрессии TP53 достоверно ассоциирована с низкими показателями выживаемости больных [51].

В экспериментах по введению опухолевых клеток РМЖ линии 4Т1 с суперэкспрессией miR-155 непосредственно в кровяное русло подопытных животных выявлено значительное увеличение метастазов в легкие, тогда как стабильная экспрессия miR-155 в первичном очаге снижает миграционный и метастатический потенциал данной клеточной линии. В ходе этих исследований показано, что *TGF4*, важный регулятор эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ), является прямой мишенью miR-155, что ранее было предсказано только теоретически [52]. К тому же эти эксперименты дополнительно свидетельствуют о двойной роли данной микроРНК, определяемой типом, локализацией и стадией развития опухоли, поскольку существуют свидетельства и о промотирующем ЕМТ-действии miR-155, полученные как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях [53]. Показано, что в опухолях молочной железы мышей MMTV-РyMT miR-155 воздействует на ЕМТ путем репрессии своей прямой мишени – дифференцировочного фактора С/ЕВРβ (ССААТ-enhancer binding protein beta). Это приводит к переключению сигнального пути TGF-β в сторону увеличения скорости роста, усиливает миграцию и инвазивный потенциал клеток. Кроме того, в этой работе впервые обнаружено, что С/ЕВРβ может действовать как активатор транскрипции Е-кадгерина [54].

Возможно, с учетом важной роли miR-155 в клетках иммунной системы следует обратить внимание и на уровень ее экспрессии в опухолеассоциированных макрофагах (ТАМ) и/или лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль (ТИЛ). Следует учитывать также и роль С/ЕВРβ в подавлении воспалительных цитокинов [9].

Существуют и другие работы, не обнаружившие прогностической значимости miR-155. Исследователи из Национального института здоровья США (National Institutes of Health) протестировали 5 широко известных микроРНК (miR-21, miR-29b, miR-34a/b/c, miR-155 и let-7a) у 639 больных, радикально прооперированных по поводу НМРЛ, и обнаружили статистически значимую зависимость экспрессии микроРНК в опухоли в долговременном прогнозе только для miR-21 [55]. Надо заметить, что эта работа была выполнена в 2009–2010 гг. с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени на парафиновых срезах опухолей, что может нивелировать уровни нативной экспрессии микроРНК в ткани и биологиче-

ских жидкостях. Исследования экспрессии miR-155, связанные с гетерогенностью популяции опухолевых клеток и эволюцией отдельных клеточных клонов в ходе опухолевой прогрессии, могли бы уточнить пределы ее использования в качестве прогностического онкомаркера.

В современной практике молекулярных исследований в клинике все шире используются биологические жидкости, полученные у онкологических больных.

Некоторые исследователи полагают, что уровень miR-155 в сыворотке таких больных является более ценным диагностическим маркером, чем тот же показатель в плазме [41], что, на наш взгляд, требует дополнительного тестирования.

В составе опухолевых экзосом, играющих активную роль в развитии вторичных опухолевых очагов, в частности в создании премеастатических ниш, часто обнаруживают miR-155 [6, 7, 56]. Это говорит в пользу утверждения об участии miR-155 в опухолевой прогрессии. Примечательно, что при рецидивах рака легкого содержание miR-155 и miR-21 в экзосомах, полученных из плазмы, выше, чем у больных с первичными опухолями [57]. В нашем исследовании циркулирующих микроРНК, в том числе в экзосомах, не обнаружено различий уровня miR-155 в плазме пациентов с плоскоклеточным раком легкого после удаления первичного очага, однако большинство тестированных больных на момент операции не имели видимых метастазов [58]. К сожалению, количество работ, прицельно исследующих miR-155 в метастазах или корреляции ее наличия в экзосомах с процессами формирования метастазов, ограничено.

Примечательно, что в нескольких работах последних лет на больших клинических выборках выявлена статистически значимая ассоциация функционального варианта miR-155 (полиморфизм rs767649) с риском развития и неблагоприятным прогнозом при НМРЛ [47], раке шейки матки [59] и гепатокарциномах [60]. Показано, что наличие в геноме вариантной аллели rs767649, образующейся в результате однонуклеотидной замены (А>Т) во фланкирующем интроне miR-155, может увеличивать ее транскрипционную активность. Такое повышение уровня транскрипции miR-155 способствует росту опухолей и метастазов путем ингибирования экспрессии *HBPI*, *TJPI*, *SMAD5* и *PRKARIA* [47].

В данном обзоре мы не затрагиваем участия теназина и QK1 в возникновении и прогрессии гемобластозов и солидных опухолей, хотя эта тема сейчас активно обсуждается в мировой литературе [29, 32]. На наш взгляд, роль этих белков в канцерогенезе заслуживает особого внимания, однако в большой степени она связана с функционированием иммунной системы.

Лекарственная устойчивость и miR-155

Преодоление первичной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, как и возникновение

резистентности к химиопрепаратам в ходе лечения является одной из глобальных задач противоопухолевой терапии.

Повышенная экспрессия miR-155 во многих типах опухолей, в частности при раке легкого, РМЖ и глиомах, часто коррелирует с устойчивостью к химиотерапии [45, 53, 61, 62]. Это, конечно же, связано с ингибированием генов, участвующих в процессах, которые во многом определяют такую устойчивость. Так, часто наблюдаемая комбинированная суперэкспрессия miR-21 и miR-155 вызывает почти полное прекращение продукции сразу 3 генов-супрессоров опухолевого роста — белков SOCS1, SOCS6 и PTEN. Одновременное ингибирование этих микроРНК приводит к резкому снижению роста и метастазирования ксенографтов опухолей легкого человека у бестимусных мышей. В настоящее время ведутся исследования по совместному использованию ингибиторов этих микроРНК в клинических условиях [48]. Кроме того, угнетение сигнального пути SOCS6-STAT3 в клетках РМЖ, опосредованное miR-155, приводит к развитию резистентности к тамоксифену [62].

МикроРНК miR-155 участвует в процессах развития резистентности, не только ингибируя вышеупомянутые гены, но также путем репрессии *FOXO3a* и *RhoA* и усиления EMT- и MAPK-сигналинга [53, 61, 63]. К тому же аутофагия, связанная со снижением продукции FOXO3a, может быть спровоцирована применением химиопрепаратов или облучением [43]. Показано, что такая нерегулируемая аутофагия при остеосаркомах вызвана именно повышением уровня miR-155 и сопровождается развитием химиорезистентности [64].

Тем не менее попытки использовать miR-155 в качестве предиктивного маркера химиорезистентности к нескольким конкретным стандартным химиопрепаратам, в частности к цисплатину, эпопозиду и таксанам [55, 65], не достигли желаемой цели. Исключением стали только наблюдения, касающиеся лекарственной

резистентности к 5-фторурацилу. Маркером устойчивости опухолевых клеток к его действию может являться сочетанная экспрессия miR-21, miR-27a/b и miR-155 [65].

Скорее всего, снижение уровня онкогенных микроРНК в целях преодоления лекарственной устойчивости возможно только с учетом сопутствующих молекулярных нарушений в опухолях определенного типа. Группа исследователей из Онкологического центра Андерсона показала, что использование препаратов, снижающих экспрессию miR-155 (anti-miR-155-DOPC), повышает чувствительность клеток аденокарциномы легкого, несущих мутации *p53*, к проводимой стандартной терапии у больных НМРЛ [51].

Использование анти-микроРНК в противоопухолевой терапии приобретает все больший размах, однако для miR-155 эти исследования находятся в стадии экспериментальных разработок и в большой степени связаны пока с модулированием иммунного ответа [13, 66].

Заключение

МикроРНК miR-155 относится к числу микроРНК, регулирующих целый ряд ключевых генов, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний. Это в значительной степени связано и с ее ролью в контроле иммунитета. В последние годы ее все чаще используют как в качестве самостоятельного онкомаркера (преимущественно при гемобластозах), так и в составе прогностических и предиктивных микроРНК-панелей. Ведутся разработки противоопухолевых препаратов, мишенью которых является miR-155, а также гены, регулирующие ее экспрессию. Не вызывает сомнений, что вопрос о механизмах влияния как miR-155, так и других микроРНК на клеточный сигналинг нуждается в тщательном и многопрофильном анализе с привлечением экспериментальных, биоинформационных и клинических данных.

Финансирование. Работы авторов по тематике обзора поддержаны из средств Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01 559).

Financing. The authors' work on the subjects was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 16-04-01 559).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136(2):215–33.
2. Iorio M.V., Croce C.M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2017;9(6):852.
3. Moss T.J., Luo Z., Seviour E.G. et al. Genome-wide perturbations by miRNAs map onto functional cellular pathways, identifying regulators of chromatin modifiers. *NPJ Syst Biol Appl* 2015;1:15001.
4. Mendell J.T., Olson E.N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 2012;148(6):1172–87.
5. Yu X., Harris S.L., Levine A.J. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006;66(9):4795–801.
6. Takahashi R.U., Prieto-Vila M., Hirónaka A., Ochiya T. The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(5):648–56.
7. Чевкина Е., Щербаков А., Журавская А. и др. Экзосомы и передача (эпигенетической) информации опухолевыми клетками. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;2(3):8–20. [Tchevkina E.M., Shcherbakov A.M., Zhuravskaya A.Yu. et al.

- Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;2(3):8–20. (In Russ.).
8. Tili E., Michaille J.J., Croce C.M. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol Rev* 2013;253(1):167–84.
 9. Ranganath P. MicroRNA-155 and its role in malignant hematopoiesis. *Biomark Insights* 2015;10:95–102.
 10. Mashima R. Physiological roles of miR-155. *Immunology* 2015;145(3):323–33.
 11. Elton T.S., Selemo H., Elton S.M., Parinandi N.L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 2013;532(1):1–12.
 12. Paladini L., Fabris L., Bottai G. et al. Targeting microRNAs as key modulators of tumor immune response. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:103.
 13. Higgs G., Slack F. The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis. *J Clin Bioinforma* 2013;3(1):17.
 14. Santos J.C., Brianti M.T., Almeida V.R. et al. *Helicobacter pylori* infection modulates the expression of miRNAs associated with DNA mismatch repair pathway. *Mol Carcinog* 2017;56(4):1372–9.
 15. Sandhu S.K., Volinia S., Costinean S. et al. miR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the E μ -miR-155 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(49):20047–52.
 16. Coira I.F., Rufino-Palomares E.E., Romero O.A. et al. Expression inactivation of SMARCA4 by microRNAs in lung tumors. *Hum Mol Genet* 2015;24(5):1400–9.
 17. Thompson R.C., Herscovitch M., Zhao I. et al. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J Biol Chem* 2011;286(3):1675–82.
 18. Liu H., Patel M.R., Prescher J.A. et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(42):18115–20.
 19. Liu M., Zhou K., Huang Y., Cao Y. The candidate oncogene (MCRS1) promotes the growth of human lung cancer cells via the miR-155-Rb1 pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:121.
 20. Song H., Li Y., Chen G. et al. Human MCRS2, a cell-cycle-dependent protein, associates with LPTS/PinX1 and reduces the telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316(4):1116–23.
 21. Tili E., Michaille J.J. Resveratrol, microRNAs, inflammation, and cancer. *J Nucleic Acids* 2011;2011:102431.
 22. Vigorito E., Kohlhaas S., Lu D., Leyland R. miR-155: an ancient regulator of the immune system. *Immunol Rev* 2013;253(1):146–57.
 23. Ji W., Zhang X., Sun X. et al. miRNA-155 modulates the malignant biological characteristics of NK/T-cell lymphoma cells by targeting FOXO3a gene. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2014;34(6):882–8.
 24. Burocchi A., Pittoni P., Tili E. et al. Regulated Expression of miR-155 is Required for iNKT Cell Development. *Front Immunol* 2015;6:140.
 25. Tili E., Michaille J.J., Adair B. et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD. *Carcinogenesis* 2010;31(9):1561–6.
 26. Yoshimura A., Ito M., Chikuma S. et al. Negative regulation of cytokine signaling in immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;a028571.
 27. Yang S., Li F., Jia S. et al. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium Tuberculosis* promotes apoptosis of macrophages via targeting the microRNA155-SOCS1 interaction. *Cell Physiol Biochem* 2015;35(4):1276–88.
 28. Piccinini A.M., Midwood K.S. Endogenous control of immunity against infection: tenascin-C regulates TLR4-mediated inflammation via microRNA-155. *Cell Rep* 2012;2(4):914–26.
 29. Midwood K.S., Chiquet M., Tucker R.P., Orend G. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci* 2016;129(23):4321–7.
 30. Tili E., Chiabai M., Palmieri D. et al. Quaking and miR-155 interactions in inflammation and leukemogenesis. *Oncotarget* 2015;6(28):24599–610.
 31. Latruffe N., Lançon A., Frazzi R. et al. Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2015;1348(1):97–106.
 32. Darbelli L., Richard S. Emerging functions of the quaking RNA-binding proteins and link to human diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2016;7(3):399–412.
 33. Vasilescu C., Dragomir M., Tanase M. et al. Circulating miRNAs in sepsis-A network under attack: an in-silico prediction of the potential existence of miRNA sponges in sepsis. *PLoS One* 2017;12(8):e0183334.
 34. Chen Y., Wang G., Liu Z. et al. Glucocorticoids regulate the proliferation of T cells via miRNA-155 in septic shock. *Exp Ther Med* 2016;12(6):3723–8.
 35. Ma F., Liu F., Ding L. et al. Anti-inflammatory effects of curcumin are associated with down regulating microRNA-155 in LPS-treated macrophages and mice. *Pharm Biol* 2017;55(1):1263–73.
 36. Edalati Fathabad M., Karimipoor M., Alizadeh S. et al. miR-155 effectively induces apoptosis in K562 Philadelphia positive cell line through upregulation of p27kip1. *Bioimpacts* 2017;7(2):109–14.
 37. Palma C.A., Al Sheikha D., Lim T.K. et al. MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia. *Mol Cancer* 2014;13:79.
 38. Xue H., Hua L.M., Guo M., Luo J.M. SHIP1 is targeted by miR-155 in acute myeloid leukemia. *Oncol Rep* 2014;32(5):2253–9.
 39. Rai D., Kim S.W., McKeller M.R. et al. Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(7):3111–6.
 40. Dagan L.N., Jiang X., Bhatt S. et al. miR-155 regulates HGAL expression and increases lymphoma cell motility. *Blood* 2012;119(2):513–20.
 41. Hou Y., Wang J., Wang X. et al. Appraising microRNA-155 as a noninvasive diagnostic biomarker for cancer detection: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(2):e2450.
 42. Xu T.P., Zhu C.H., Zhang J. et al. MicroRNA-155 expression has prognostic value in patients with non-small cell lung cancer and digestive system carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(12):7085–90.
 43. Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics* 2015;5(10):1122–43.
 44. Mirzaei H., Gholamin S., Shahidsales S. et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *Eur J Cancer* 2016;53:25–32.
 45. Barbano R., Palumbo O., Pasculli B. et al. A miRNA signature for defining aggressive phenotype and prognosis in gliomas. *PLoS One* 2014;9(10):e108950.
 46. Wang F., Zhou J., Zhang Y. et al. The value of microRNA-155 as a prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2015;10(8):e0136889.
 47. Xie K., Ma H., Liang C. et al. A functional variant in miR-155 regulation region contributes to lung cancer risk and survival. *Oncotarget* 2015;6(40):42781–92.
 48. Xue X., Liu Y., Wang Y. et al. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget* 2016;7(51):84508–19.
 49. Slattery M.L., Lundgreen A., Kadlubar S.A. et al. JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer. *Mol Carcinog* 2013;52(2):155–66.
 50. Yang M., Shen H., Qiu C. et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(3):604–15.
 51. van Roosbroeck K., Fanini F., Setoyama T. et al. Combining anti-mir-155 with chemotherapy for the treatment of lung cancers. *Clin Cancer Res* 2017;23(11):2891–904.

52. Xiang X., Zhuang X., Ju S. et al. miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT. *Oncogene* 2011;30(31):3440–53.
53. Yu D., Lv M., Chen W. et al. Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer. *Tumor Biol* 2015;36(3):1395–401.
54. Johansson J., Berg T., Kurzejamska E. et al. MiR-155-mediated loss of C/EBP β shifts the TGF- β response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene* 2013;32(50):5614–24.
55. Voortman J., Goto A., Mendiboure J. et al. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 2010;70(21):8288–98.
56. Yu X., Odenthal M., Fries J.W. Exosomes as miRNA Carriers: formation-function-future. *Int J Mol Sci* 2016;17(12).
57. Munagala R., Aqil F., Gupta R.C. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer. *Tumour Biol* 2016;37(8):10703–14.
58. Aushev V.N., Zborovskaya I.B., Laktionov K.K. et al. Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2013;8(10):e78649.
59. Wang S., Cao X., Ding B. et al. The rs767649 polymorphism in the promoter of miR-155 contributes to the decreased risk for cervical cancer in a Chinese population. *Gene* 2016;595(1):109–14.
60. Ji J., Xu M., Tu J. et al. MiR-155 and its functional variant rs767649 contribute to the susceptibility and survival of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(37):60303–9.
61. Kong W., He L., Coppola M. et al. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem* 2010;285(23):17869–79.
62. Teoh S.L., Das S. The role of MicroRNAs in diagnosis, prognosis, metastasis and resistant cases in breast cancer. *Curr Pharm Des* 2017;23(12):1845–59.
63. Urbánek P., Klotz L.O. Posttranscriptional regulation of FOXO expression: microRNAs and beyond. *Br J Pharmacol* 2017;174(12):1514–32.
64. Chen L., Jiang K., Jiang H., Wei P. miR-155 mediates drug resistance in osteosarcoma cells via inducing autophagy. *Exp Ther Med* 2014;8(2):527–32.
65. Geretto M., Pulliero A., Rosano C. et al. Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators. *Am J Cancer Res* 2017;7(6):1350–71.
66. Shah M.Y., Ferrajoli A., Sood A.K. et al. microRNA therapeutics in cancer – an emerging concept. *E Bio Medicine* 2016;12:34–42.

Роль эпигенетических факторов в патогенезе нейрофиброматоза 1-го типа

Р.Н. Мустафин¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»; Россия, Республика Башкортостан, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32;

²ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН;

Россия, Республика Башкортостан, 450054 Уфа, проспект Октября, 71

Контакты: Эльза Камилевна Хуснутдинова elzakh@mail.ru

В обзорной статье описана роль эпигенетических факторов в туморогенезе нейрофиброматоза 1-го типа (НФ1). Клиническая картина НФ1 характеризуется выраженным полиморфизмом – от стертых форм с единичными нейрофибромами до тяжелых проявлений с тысячами опухолей и злокачественными осложнениями. Несмотря на выявление более 1400 типов мутаций в гене *NF1*, большинством исследователей не обнаружено генофенотипических корреляций. Второе генетическое событие в гене *NF1*, выявляемое в шванноцитах большинства нейрофибром, может быть результатом общих нарушений стабильности генома и регуляции клеточного цикла. Вероятность тканеспецифической инактивации второго аллеля чрезвычайно мала и не может объяснить образование опухолей у большинства больных НФ1. В то же время роль эпигенетических факторов в блокировании онкосупрессоров доказана и может иметь значение в развитии данного заболевания, в пользу чего говорит закономерное начало образования нейрофибром в пубертатном периоде, утяжеление клиники при наследовании болезни от матери. Представлены исследования роли определенных микроРНК и особенностей метилирования промоторной области *NF1* в туморогенезе при НФ1, а также роли мутаций в гене *NF1* в развитии спорадических злокачественных новообразований. В связи с возможностью фармакологической коррекции активности микроРНК с использованием антисмысловых последовательностей изучение эпигенетических процессов при НФ1 перспективно для диагностики и лечения не только данной болезни, но и спорадических злокачественных новообразований.

Ключевые слова: нейрофиброматоз 1-го типа, нейрофибромин, туморогенез, импринтинг, микроРНК, метилирование, CpG-островки

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-35-49

The role of epigenetic factors in the pathogenesis of neurofibromatosis type 1

R.N. Mustafin¹, E.K. Khusnutdinova^{1,2}

¹Bashkir State University; 32 Zaki Validi St., Ufa 450076, Republic of Bashkortostan, Russia;

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Russian Academy of Sciences;

71 Prospekt Oktyabrya, Ufa 450054, Republic of Bashkortostan, Russia

The article describes the role of epigenetic processes in the tumorigenesis of neurofibromatosis type 1. The clinical manifestations of neurofibromatosis type 1 is characterized by a pronounced polymorphism erased from with single neurofibromas to severe forms with thousands of tumors and complications even in patients with the same mutations. More than 1400 mutations in the *NF1* gene have been reported, but have not yet identified genotype-phenotype correlations. Detected in the majority of neurofibromas mutation of the second allele of the gene *NF1* and loss of heterozygosity may result from common disorders of genome stability and cell cycle regulation. Chance of tissue-specific inactivation of the second allele is extremely low and can not prove the detection of neurofibromas in most patients with neurofibromatosis type 1. At the same time, the role of epigenetic factors for blocking of oncosuppressors has been proven and can be applied to the development of malignant tumors and neurofibromas. This assumption is proved by the fact that the majority of neurofibromas are formed in puberty, while inheriting the disease from mother to clinical manifestations more severe. This review presents the research on the role of miRNAs and specific methylation in the promoter region of *NF1* tumorogenesis in neurofibromatosis type 1. Mutations in the *NF1* gene are of great importance in the development of many malignancies. Due to the possibility of pharmacological correction of activity of microRNAs using antisense sequences, the study of epigenetic processes in neurofibromatosis type 1 promising to diagnose and treat not only the disease but also sporadic malignancies.

Key words: neurofibromatosis type 1, neurofibromin, tumorigenesis, imprinting, microRNA, methylation, CpG-islands

Введение

Нейрофиброматоз 1-го типа (НФ1) – распространенное аутосомно-доминантное заболевание с опухолевым синдромом, встречающееся в мире в среднем с частотой 1:3,0–3,5 тыс. населения [1–4]. Характерной

клинической чертой болезни являются множественные доброкачественные новообразования – нейрофибромы, гамартомы радужной оболочки глаза и пигментные пятна на коже цвета «кофе с молоком». Плексиформные нейрофибромы, отличающиеся инфильтративным

ростом и склонностью к озлокачествлению, встречаются у 30 % больных НФ1. Риск развития глиом зрительного нерва составляет до 20 %, злокачественных опухолей из оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) 5–10 % [2, 3, 5]. Все развивающиеся опухоли устойчивы к химиотерапии, хирургическое иссечение опухолей часто провоцирует образование новых нейрофибром [6].

MPNST – наиболее характерные для НФ1 злокачественные опухоли. Другие распространенные опухоли при НФ1 представлены в табл. 1.

Ген *NF1* картирован на 17q11.2 и кодирует белок нейрофибромин, содержащий высококонсервативный ГТФаз-активирующий домен, превращающий активные RAS-ГТФ путем отсоединения остатка фосфорной кислоты в RAS-ГДФ, которая неактивна (рис. 1). Потеря экспрессии нейрофибромина приводит к активации

RAS-сигнальных путей и способствует образованию опухолей [8]. Помимо ингибирования RAS, нейрофибромин положительно регулирует аденилатциклазу, RAS независимо влияет на апоптоз, регулирует адгезию и подвижность клеток [9].

В целях нахождения причин патологии поиск мутаций в гене *NF1* у больных НФ1 проводится по всему миру. В России молекулярно-генетическое исследование с описанием клинической картины больных с выявленными мутациями проведено в работах О.В. Дрозд и соавт. [11], Р.Н. Мустафина и соавт. [12]. В базе данных генных мутаций человека (The Human Gene Mutation Database, 2015) зарегистрировано более 1400 различных мутаций в гене *NF1*, расположенных практически во всех экзонах [13]. У 5 % больных НФ1 с идентифицированными мутациями выявляются микроделеции *NF1*, затрагивающие соседние гены [3, 14]. Несмотря

Таблица 1. Сравнение частоты развития злокачественных опухолей при нейрофиброматозе 1-го типа и в общей популяции

Вид опухоли	Частота развития при нейрофиброматозе 1-го типа, %	Частота развития в популяции, %
Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов	5,0–10,0	0,001
Гастроинтестинальные стромальные опухоли	3,9–25,0	0,0001
Рак молочной железы	18,5	9
Рабдомиосаркома	1,4–6,0	0,000003
Лейкоз	2,0	0,01
Карциноидные опухоли	1,0	0,00003
Феохромоцитомы	0,1–5,7	0,00008

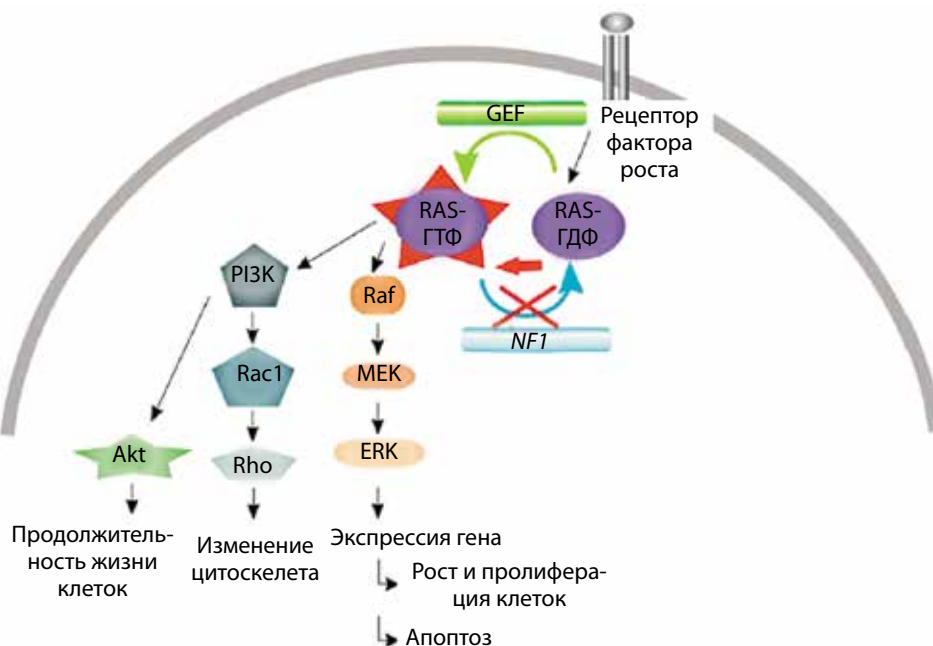


Рис. 1. Схема онкосупрессивного действия нейрофибромина (адаптировано из [10])

на огромный генетический банк данных, исследователями не обнаружено генофенотипических корреляций [13], что дает возможность использования полученных данных лишь для ранней пренатальной диагностики. Однако это не является решением проблемы и вызывает множество спорных биоэтических вопросов (в связи с необходимостью прерывания беременности), поэтому оправдан поиск новых путей патогенеза болезни для возможной коррекции опухолевого синдрома.

Основная идея механизма туморогенеза при НФ1 объясняется двухударной моделью, согласно которой опухоли образуются в результате 2-го генетического события гена опухолевой супрессии [15]. Обоснованием данной идеи являются факты обнаружения биаллельной инактивации гена *NF1* в нейрофибромах при НФ1 [16], причем только в шванноцитах, не выявляемые в других клетках микроокружения [17, 18]. Также в экспериментальных работах при трансплантации мышцам химерных *NF1*–/– клеток у мышей развивались опухоли, напоминающие нейрофибромы у людей [19]. У мышей со специфической инактивацией гена *NF1* в центральной нервной системе формировались глиомы зрительных нервов как результат пролиферации глиальных клеток-предшественников. У эмбрионов мышей с *NF1*–/– спинальным гребнем формировалось повышенное количество клеток-предшественников олигодендроцитов [20].

Помимо мутаций, на экспрессию нейрофибромина могут воздействовать и другие механизмы (табл. 2): процессинг, стабилизация и транспорт матричной РНК (мРНК) гена *NF1*. Имеет значение неравноценная экспрессия гена *NF1*, обнаруженная в фибробластах, лимфоцитах, кератиноцитах и меланоцитах [8]. Соответственно, для данных клеток неравноценная экспрессия может вызвать эффект, подобный потере гетерозиготности (loss of heterozygosity, ЛОН), по следующему механизму: у больных НФ1 один из аллелей инактивирован в результате мутации, выработка нейрофибромина поддерживается за счет оставшегося второго аллеля. Однако при подавлении экспрессии данного аллеля гена эпигенетическими механизмами выработка нейрофибромина полностью прекращается – ЛОН-подобный эффект (полностью прекращается выработка продукта гена). В результате эпигенетической инактивации второго аллеля гена *NF1*, являющегося геном опухолевой супрессии, потеря его

экспрессии приводит к гиперпролиферации клеток и туморогенезу.

Высококонсервативная среди разных видов 3'-нетранслируемая область *NF1* связывается с опухолевым антигеном HuR и содержит 4 потенциальных белоксвязывающих домена, которые могут представлять дополнительные механизмы контролирования мРНК стабильности, внутриклеточной локализации и эффективности трансляции [8].

Транскрипционный контроль гена *NF1* осуществляется посредством эпидермального фактора роста (EGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) [21]. Большое значение в подавлении функции *NF1* имеют микроРНК: путем репрессии трансляции, воздействия на расщепление и деградацию мРНК [22].

Особенности функционирования гена *NF1*

Для определения возможных причин отсутствия корреляции клинических проявлений с типом мутаций в гене *NF1* необходим поиск новых молекулярно-генетических механизмов формирования болезни. Ген *NF1* размером 280 кб картирован в прицентромержной области длинного плеча хромосомы 17 и состоит из 57 экзонов. Известны 4 нормальные внутрирамочные изоформы альтернативного сплайсинга продукта гена *NF1*, экспрессирующиеся во всех тканях в разных концентрациях: экзон 9b (добавочные 30 пар нуклеотидов (п.н.) между экзонами 9 и 10a), экзон 10a-2 (45 п.н. между экзонами 10a и 10b), экзон 23a (63 п.н. между экзонами 23 и 24), экзон 48a (54 п.н. в направлении 3'-конца гена). Выявлены несколько дополнительных вариантов сплайсинга, экспрессирующихся в низких концентрациях – альтернативные транскрипты ex29-, ex30-, ex29/30-, N-изоформы, отличающиеся различной степенью активности в тканях [23]. Включение экзона 23a происходит под влиянием белков TIA-1/TIAR, а под действием Hu-белка угнетается [24].

В геноме человека содержатся 11 последовательностей, родственных *NF1*, 9 из которых расположены в центромержных областях 7 различных хромосом. Псевдогены *NF1* расположены на хромосомах 2, 12, 14, 15, 18, 21 и 22 [10].

Темп мутирования гена *NF1* на 2 порядка выше, чем в других локусах – до 1 на 10 тыс. гамет [4, 25]. Однако с учетом частоты встречаемости болезни 1:3,0–

Таблица 2. Механизмы изменения экспрессии нейрофибромина

Мишень воздействия	Причина инактивации
Экзоны <i>NF1</i>	Мутации гена <i>NF1</i>
Промоторная область гена <i>NF1</i>	Метилирование
Процессируемая матричная РНК гена <i>NF1</i>	Расширение рамки считывания экзона <i>NF1</i> при процессинге, образование стоп-кодона
3'-нетранслируемая область матричной РНК	микроРНК

3,5 тыс. населения, а также, в среднем, половины спорадических случаев НФ1, темп мутирования гена должен быть не менее 1 на 6–7 тыс. гамет. До 50 % точковых мутаций обнаруживаются в сайтах сплайсинга, в то время как существуют 4 нормальные сплайсинговые изоформы [26], а также, как упомянуто выше, выявляются дополнительные варианты сплайсинга, экспрессирующиеся в низких концентрациях [23]. Ген *NF1* регулирует пролиферацию клеток, при этом сплайсинговые изоформы обладают разной активностью и преимущественно экспрессируются в определенных тканях. Например в нервных клетках преимущественная экспрессия сплайсинговых изоформ нейрофибромина, обладающих низкой активностью, может поддерживать низкий пролиферативный потенциал. Поскольку ген *NF1* является онкосупрессором, опосредованно (влиянием на RAS-систему) регулируя пролиферацию клеток, экспрессия сплайсинговых изоформ в различных тканях может влиять на возрастзависимую тканеспецифическую дифференцировку клеток в связи с различной активностью данных изоформ, преимущественная экспрессия специфических изоформ в различных тканях в разные периоды онтогенеза — на скорость клеточных делений. Высокая частота сплайсинговых мутаций иногда связана со сложными взаимодействиями гена *NF1* и продуктов его экспрессии с другими факторами, которые могут влиять на темп мутирования в сайтах сплайсинга, 11 родственных *NF1*-последовательностей могут влиять на данные процессы совместно.

Согласно исследованиям К. Wimmer и соавт. ген *NF1* содержит «горячие точки» для инсерции L1-элементов. Выявлены 3 специфических интеграционных сайта для независимых событий транспозиции в гене *NF1*, каждый из которых используется дважды: с. 1642-1_1642 в интроне 14, с. 2835_2836 в экзоне 21, с. 4319_4320 в экзоне 33. Поскольку по данным недавних исследований в онтогенезе происходит перемещение ретроэлементов, а ген *NF1* является предпочтительным сайтом их интеграции, данный процесс может иметь значение в инактивации второго аллеля гена в патогенезе формирования нейрофибром при НФ1 [26]. Существование «горячих точек» мутагенеза в гене *NF1* может в некоторой степени объяснить наличие большого количества псевдогенов и повышенной мутабельности гена. Наличие L1-элементов в гене приводит к усилению мутагенеза и образованию псевдогенов в связи с тем, что ретроэлемент транспозирует в новый локус, оставляя исходную последовательность на прежнем месте. В результате возможны структурные преобразования генома, в том числе формирование псевдогенов [27]. Псевдогены — неактивные копии исходных генов, измененных мутациями; некоторые из их разновидностей представлены процессированными псевдогенами, в которых отсутствуют интроны гена-предшественника (образованные путем встраивания комплементарной ДНК с помощью

генов автономных ретротранспозонов). Многие псевдогены эукариот высоко консервативны и активно транскрибируются, а часть может быть активирована мутациями [28].

С учетом того, что в общебиологическом плане феномен метилирования является элементом системы распознавания, выполняя защитную функцию, направленную на предохранение организма от чужеродной ДНК и избытка эндогенных повторов [29], логично предположить следующий механизм инактивации одного из аллелей *NF1* в определенных тканях с возрастом. Известно, что в онтогенезе могут активироваться определенные ретроэлементы, влияя на дифференцировку клеток с возрастом. Ген *NF1* регулирует цитологическую дифференцировку. Поскольку в гене имеются «горячие точки» инсерции для L1-транспозонов, характер метилирования гена может играть защитную роль, препятствуя тем самым внедрению транспозонов.

Промотор гена расположен в CpG-богатой области [30]. Согласно данным литературы промоторная область *NF1* вблизи стартового сайта транскрипции полностью деметилирована в клетках многих нормальных тканей [31]. Данная особенность может свидетельствовать в пользу возможного влияния метилирования на патогенез опухолевого синдрома.

Около 50 % случаев НФ1 обусловлены мутациями *de novo*, при этом 90 % из них определяются в отцовских хромосомах [25]. Возможные причины данного феномена — влияние микроРНК и геномный импринтинг в связи с тем, что при наличии мутаций *de novo* материнского происхождения эпигенетическое подавление экспрессии аллеля гена *NF1* отцовского происхождения может быть несовместимым с жизнью (инактивация обоих аллелей на ранних этапах эмбрионального развития приводит к летальным порокам развития). В случае семейных форм при наследовании от матери наблюдается утяжеление клиники, однако нелетальное благодаря эпигенетическим механизмам перестройки генома в яйцеклетках.

В интроне 27b расположены 3 небольших гена, транскрибирующиеся в обратной ориентации к *NF1*: *OMGP*, *EVI2A*, *EVI2B*. Функция данных генов направлена на регуляцию пролиферации клеток, при этом интрон расположен между экзонами, кодирующими функционально активный Sec14p-домен [10].

Продукт экспрессии гена *NF1* содержит несколько функционально-активных доменов, 3 из которых наиболее важны для его функции (рис. 2). ГТФаз-активирующий домен взаимодействует со всеми 3 изоформами RAS-белков. Цистеин-серин-богатый домен (CSRD) взаимодействует с циклической аденозинмонофосфатзависимой протеинкиназой A, регулирует взаимодействие с микротубулами. Sec14p-домен регулирует расположение нейрофибромина на эндомембранах, облегчает взаимодействие с глицерофосфолипидами для селективной регуляции RAS [10]. Идентифицирован также плекстрингомолгич-

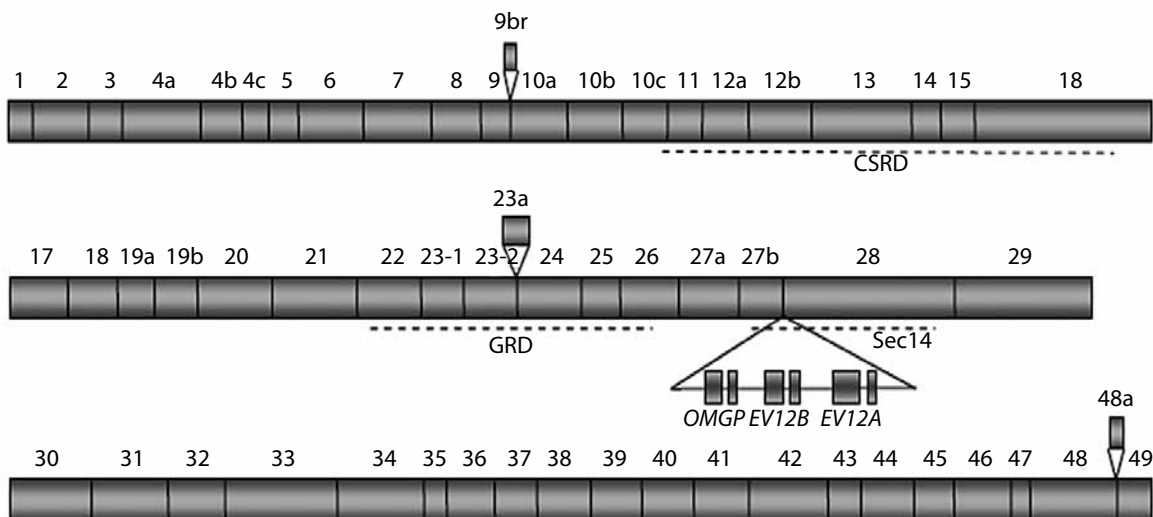


Рис. 2. Схема гена *NF1* с основными доменами (адаптировано из [10]). *CSRD* – цистеин-серин-богатый домен; *GRD* – связанный с ГТФаз-активирующим белком домен (*GAP* (*GTPase-activating protein*) – related domain)

ный (PH) домен, совместно с *Sec14*-доменом модулирующий актиновый цитоскелет [13].

На сегодняшний день известны не менее 7 доменов нейрофибромина, посредством которых он взаимодействует с большим количеством белков, участвуя в разнообразных внутриклеточных процессах (рис. 3) [13]. Он реагирует с белком *SPRED1*, также влияющим на *RAS*-систему. Нейрофибромин является основным *GAP*-белком для *RAS* в дендритах нейронов, где посредством лейцинбогатого домена он взаимодействует с молекуляр-

ным проводником (шапероном) – валозинсодержащим белком (*VCP*). При взаимодействии с убиквитинлигазами продукт экспрессии *NF1* подвергается деградации путем убиквитинирования, что повышает активность *RAS*. Так, убиквитинлигаза *SAG* посредством подобных взаимодействий стимулирует развитие сосудов, а убиквитинлигаза куллин 3 в клетках спорадических глиобластом разрушает нормальный нейрофибромин. Таким образом, изменения активности белков, взаимодействующих с продуктом экспрессии *NF1*, могут приводить

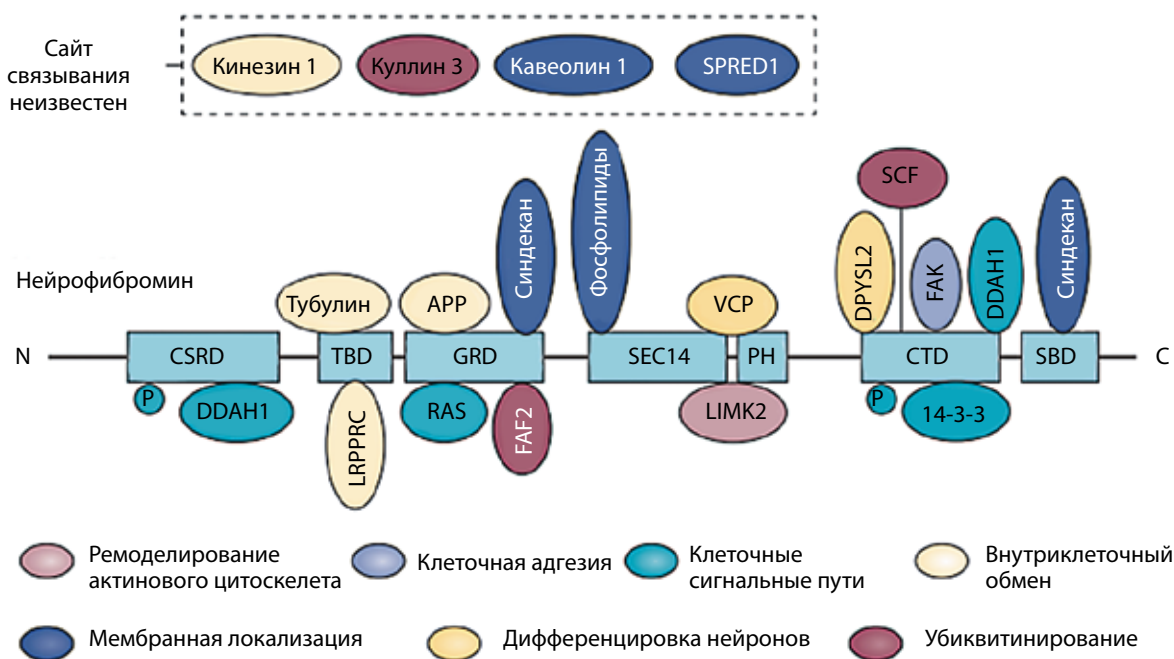


Рис. 3. Схема взаимодействия нейрофибромина с биомолекулами. Домены белка: *CSRD* – цистеин-серин-богатый домен, *TBD* – тубулинсвязывающий домен, *GRD* – связанный с ГТФаз-активирующим белком домен (*GAP* (*GTPase-activating protein*) – related domain), *Sec14*-домен, *PH* – плекстрингомологичный домен, *CTD* – карбокситерминальный домен, *SBD* – синдекансвязывающий домен (адаптировано из [13])

к его инактивации и являться одной из причин иницирования туморогенеза [13].

Патогенез опухолевого синдрома при нейрофиброматозе 1-го типа

В настоящее время механизмом туморогенеза при НФ1 принято считать двухударную модель 2-го генетического события онкосупрессорного гена. Действительно, в злокачественных опухолях и нейрофибромах часто выявляется биаллельная инактивация *NF1*, в том числе ЛОН. Предполагается, что один из механизмов инактивации второго аллеля *NF1* происходит во время репарации ДНК, особенно при гомологичной рекомбинации [32]. Механизмы, ведущие к биаллельной инактивации включают потерю хромосомы с редупликацией, митотическую рекомбинацию, хромосомные микроделеции, а также соматические внутригенные мутации [21]. Однако мутации во втором аллеле, по данным многочисленных исследований, не совпадают с первичной мутацией гена, вызвавшей заболевание [15, 33]. Среди соматических мутаций второго аллеля наиболее распространенными оказались мутации со сдвигом рамки считывания, из них наиболее часто встречающиеся — делеция не менее 4 п.н. Частота выявления ЛОН составляет 20 % [21]. В исследованиях D.R. Stewart и соавт. при изучении клеточной линии, выделенной из гломусных опухолей при НФ1, обнаружена митотическая рекомбинация в 22 % клеток. Однако исследование проводили в клеточных линиях опухолей, редко (лишь у 5 %) встречающихся при НФ1, выделенных лишь из 4 образцов опухолей, что дает статистически малодостоверный результат [34]. Более того, даже при применении полученных данных в качестве объяснения туморогенеза при НФ1 рекомбинация лишь в 22 % случаев не может объяснить образование опухолей у всех больных НФ1.

Высокий темп (до 1 на 10 тыс. гамет) мутирования гена *NF1* [4] также не может объяснить образование нейрофибром у 95 % пораженных. Характерна также взаимосвязь образования опухолей и возраста — в большинстве случаев нейрофибромы начинают формироваться в пубертате — в период, когда в организме происходят серьезные физиологические сдвиги под действием эпигенетических процессов. В связи с вышеизложенным становится понятным, что выявленные мутации второго аллеля гена *NF1* являются, скорее, не иницирующими, а результатом общих нарушений стабильности генома и регуляции клеточного цикла. Промотор гена расположен в CpG-богатой области [30], в связи с чем обоснованно проведение сравнительного анализа паттернов метилирования CpG-динуклеотидов промоторной области гена *NF1* у больных НФ1, а также общего гипометилирования генома. При отличии метилирования геномной ДНК из тканей опухолей по сравнению с ДНК лейкоцитов крови можно утверждать, что мутации во втором аллеле гена *NF1* могут быть следствием общих дестабилизирующих

изменений в геноме или (под действием микроРНК) в области геномной нестабильности [22]. В подтверждение можно привести пример обнаружения мутаций *NF1* более чем в 10 % образцов рака легких, появляющихся на поздних стадиях туморогенеза, тогда как при НФ1 нет выраженной предрасположенности к данному виду рака, сравнимой с другими злокачественными новообразованиями [13].

Уровни экспрессии продукта гена *NF1* отличаются в различных тканях и на разных этапах онтогенетического развития [10], что указывает на роль эпигенетических факторов в регуляции гена. Нарушение регуляции с помощью микроРНК или изменения метилирования у здорового человека компенсируется функцией второго аллеля, в то время как при НФ1 данные нарушения ведут к потере функции нейрофибромина и образованию опухолей.

В патогенезе опухолевого синдрома большое значение имеют иммунологические нарушения. В крови больных НФ1 обнаружено повышенное количество активированных моноцитов крупных размеров с CD16-экспрессией, а также высокие уровни цитокинов IL-1 β и IL-6 [23]. Выявлена корреляция уровней иммуноглобулина E в сыворотке больных НФ1 с количеством нейрофибром, а также с размерами плексиформных нейрофибром [35], что подтверждается эффективностью длительного применения кетотифена в лечении болезни. Нейрофибромы густо инфильтрированы мастоцитами, которые принимают активное участие в инициации и прогрессировании опухолевого процесса за счет дегрануляции и высвобождения медиаторов, повреждающих внеклеточный матрикс, усиливая пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. Мастоциты выделяют также белок, ремоделирующий клеточные ассоциации и иницирующий неоангиогенез, а также факторы роста нервных и эндотелиальных клеток. В то же время *NF1*-мутантные шванноциты секретируют Kit-лиганд, стимулирующий миграцию мастоцитов [36]. Таким образом, формируется своеобразный замкнутый патофизиологический процесс (рис. 4), который подвергается влиянию других факторов (в противном случае происходила бы тотальная безостановочная генерализация, приводящая, в конце концов, к летальному исходу). В действительности характер туморогенеза при НФ1 в каждом случае индивидуален, часто встречается стертая клиника с единичными опухолями, при генерализованных формах туморогенез в определенные моменты значительно стихает, достигая своего максимума в пубертатном периоде. Наиболее вероятной причиной являются особенности онтогенетического регулирования эпигенетическими факторами в разном возрасте [37]. Одновременно данные обстоятельства говорят о выраженной дисфункции иммунной системы, с патологической гиперактивацией и пролиферацией мастоцитов. В связи с этим важно проводить эпигенетические

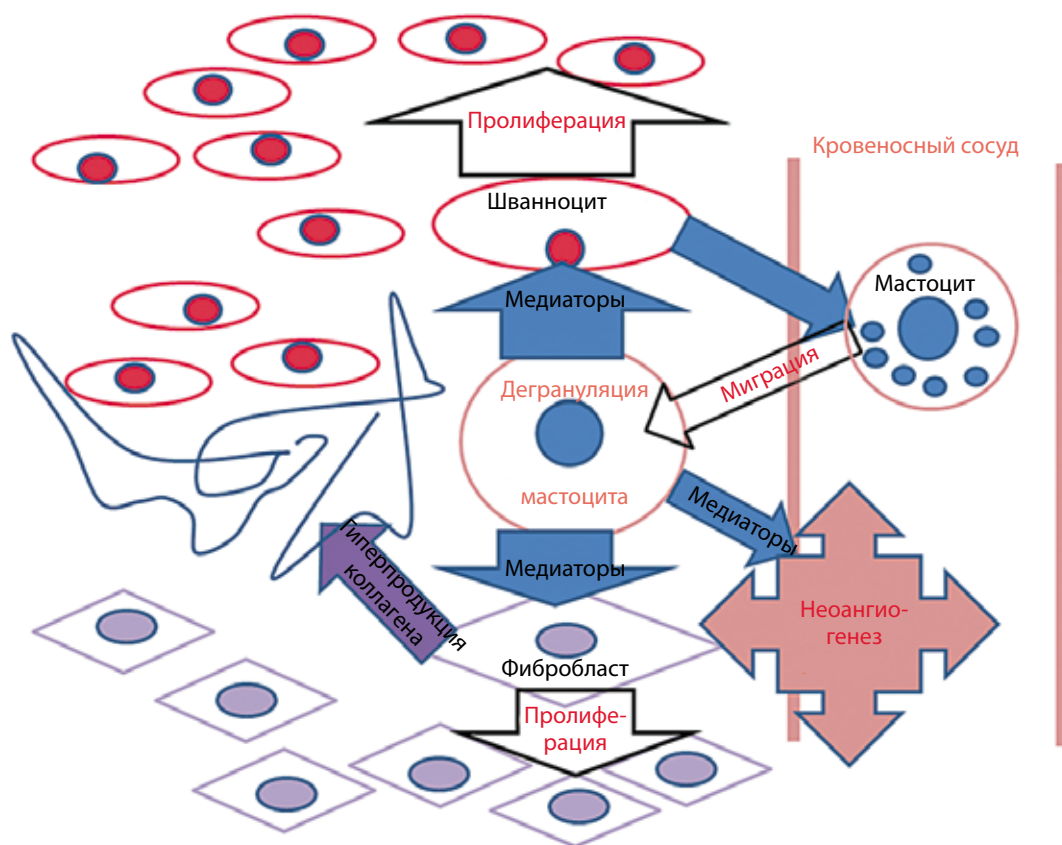


Рис. 4. Схема механизма прогрессирования нейрофибромы

исследования не только опухолей, но и клеток периферической крови больных НФ1.

Дегрануляция мастоцитов в тканях опухоли вызывает выброс медиаторов, способствующих пролиферации шванноцитов и фибробластов. Пролiferирующие фибробласты продуцируют повышенное количество коллагена, что приводит к образованию стромы опухоли. Пролiferирующие шванноциты вырабатывают Kit-лиганд, способствующий миграции мастоцитов (которые далее активно дегранулируют и приводят к прогрессированию опухолевого процесса).

Роль гена *NF1* в спорадическом канцерогенезе

Комплексное исследование с анализом соматических мутаций в моделях более 1500 связанных с раком генов в крупной панели опухолей легких, молочной железы, яичников, поджелудочной железы и предстательной железы выявило, что *NF1* — один из 10 наиболее часто мутирующих генов при данных типах опухолей (частота мутаций >5 %) [13]. Частота обнаружения мутаций в гене *NF1* у больных с ювенильной миеломоноцитарной лейкемией достигает 30 %. В то же время лишь 10–14 % детей с данным типом лейкоза страдают НФ1. Данное обстоятельство говорит о роли мутаций *NF1* в генезе спорадических форм миелолейкоза [25].

В различных исследованиях выявляются соматические мутации *NF1* при раке, не ассоциированном с НФ1: глиобластомы, аденокарциномы легких, рак молочной железы, лейкозы, серозные карциномы яичников, нейробластомы. Некоторые изменения в гене *NF1* в данных опухолях определяются относительно часто и могут быть использованы в качестве специфических прогностических и диагностических маркеров. Например, *NF1* инактивирован в 23 % случаев спорадических глиобластом, что позволяет выделить данный мезенхимальный молекулярный подкласс. В 22 % серозных карцином яичников определяются мутации *NF1*, из них в 70 % случаев инактивация *NF1* биаллельна [6].

При меланоме 3-го класса (ассоциированных с возрастом) в 30 % случаев обнаруживают делеционные мутации *NF1*. Мутации *NF1* при кожных меланомах встречаются в 14 %, при раке легкого — в 12 %, при колоректальной карциноме — в 5 %, при раке молочной железы — в 3 % случаев; при остром миелолейкозе взрослых полная потеря экспрессии *NF1* выявлена у 7 % больных. Встречаемость мутаций при других видах рака представлена в табл. 3. Предполагается, что инактивация *NF1* при некоторых видах опухолей является причиной резистентности к терапии и неблагоприятных исходов [9]. Так, в работе М.Н. Nissan и соавт. при исследовании клеточной линии меланомы

Таблица 3. Частота обнаружения мутаций в гене *NF1* при спорадическом раке

Вид злокачественной опухоли	Частота обнаружения мутаций <i>NF1</i> , %
Эмбриональная рабдомиосаркома	35
Спорадические феохромоцитомы	26–41
Глиобластомы	23
Серозные карциномы яичников	22
Кожные меланомы	14
Рак легкого	12
Миксофибросаркома	10
Плеоморфная липосаркома	8
Острый миелолейкоз взрослых	7
Нейробластомы	6
Колоректальная карцинома	5

по мутации в гене *BRAF (V600E)* показано, что потеря *NF1* дает клеткам селективные преимущества и устойчивость к *RAF*-ингибиторам [38]. В исследованиях М. Holzel и соавт. доказано, что *NF1* контролирует ответ на ретиноевую кислоту через *RAS*-*MEK*-сигнальный каскад путем ингибирования экспрессии *RAR/RXR* коактиватора *ZNF423*. Клеточные линии нейробластомы с *NF1*-нокдауном проявляли устойчивость к ретиноевой кислоте. При этом мутации *NF1* выявляются в 6 % спорадических нейробластом [39].

Исследование метилирования промоторной области гена *NF1* при нейрофиброматозе 1-го типа

Важнейшая эпигенетическая модификация, статус которой в организме достоверно меняется с течением жизни – метилирование ДНК [40] – механизм геномного импринтинга и регуляции всей программы развития. У эукариот метилирование видо- и тканеспецифично, контролируется гормонами, изменяется с возрастом и является одним из механизмов клеточной и половой дифференцировки. Профиль метилирования изменяется при канцерогенезе, служит надежным диагностическим признаком разных форм рака [41].

В норме в организме человека метилировано до 70 % CpG-динуклеотидов, или 3–6 % всех цитозинов [40]. Распространенным механизмом инактивации генов-онкосупрессоров при опухоленезе является гиперметилирование промотора – данная «эпимутация» считается функциональным эквивалентом ЛОН [42]. Локальное гиперметилирование при этом распространяется на относительно небольшую часть (20 %) динуклеотидов CpG, образующих соответствующие островки [29]. Подавление продукции нейрофибромина в результате метилирования *NF1* наблюдается

в раковых клетках [13]. Логично предположить, что и при НФ1 инициирующим для образования опухолевых клеток может служить физиологическое гиперметилирование одного из аллелей. Физиологическое – значит, что для генома человека описаны возрастные характеристики процесса метилирования ДНК, имеющие ткане- и возрастспецифический характер. Различна также роль ДНК метилтрансфераз в клетках на различной стадии дифференцировки [29]. В пубертате происходят серьезные физиологические перестройки в организме под действием гормонов, в том числе для регуляции функций определенных тканей необходимо регулирование функции генов. В данном возрасте характерно образование большинства нейрофибром при НФ1. Основной причиной этого может служить гиперметилирование промоторной области *NF1* – гена, регулирующего пролиферативную активность клеток – соответственно, инактивация одного из его аллелей для резких физиологических переходов оправданна.

Перерождение плексиформных нейрофибром в MPNST при НФ1 – распространенный процесс. Особенности метилирования могут быть вовлечены в развитие различных типов нейрофибром и злокачественную трансформацию. В работе А. Harder и соавт. при исследовании паттерна метилирования промотора *NF1* бисульфитным геномным секвенированием НФ1-ассоциированных 9 кожных и 7 плексиформных нейрофибром, 5 MPNST и 20 контрольных образцов ДНК из лейкоцитов периферической крови было выявлено специфическое метилирование сайтов связывания транскрипционных факторов для SP1, CRE (-10), AP-2; гиперметилирование промотора в НФ1-ассоциированных опухолях не обнаружено [43]. Однако М.Р. Hogan и соавт. при исследовании нейрофибром и лимфоцитов периферической крови больных НФ1 и в группе контроля обнаружили опухолеспецифическое метилирование в 6 отдельных CpG-сайтах в позициях -609, -429, -406, -383, -331, -315 по отношению к сайту начала транскрипции [42]. В работе L. Fishbein и соавт. проведен анализ метилирования промотора *NF1* в нормальных шванноцитах и образцах плексиформных нейрофибром от больных НФ1, в которых соматические мутации второго аллеля не были выявлены. Однако в позиции -451 по отношению к сайту начала транскрипции определено специфическое метилирование в 12 из 18 анализируемых опухолей [31].

D.Н. Gutmann и соавт. при сравнительном исследовании паттерна метилирования *NF1* низкодифференцированных глиом обнаружили значительные различия с данными по спорадическим опухолям, что дало основание считать метилирование *NF1* в качестве возможной причины биаллельной инактивации гена [44].

У животных, как и у человека, существует тканевая (клеточная), субклеточная и возрастная разнокачественность (специфичность) метилирования ДНК.

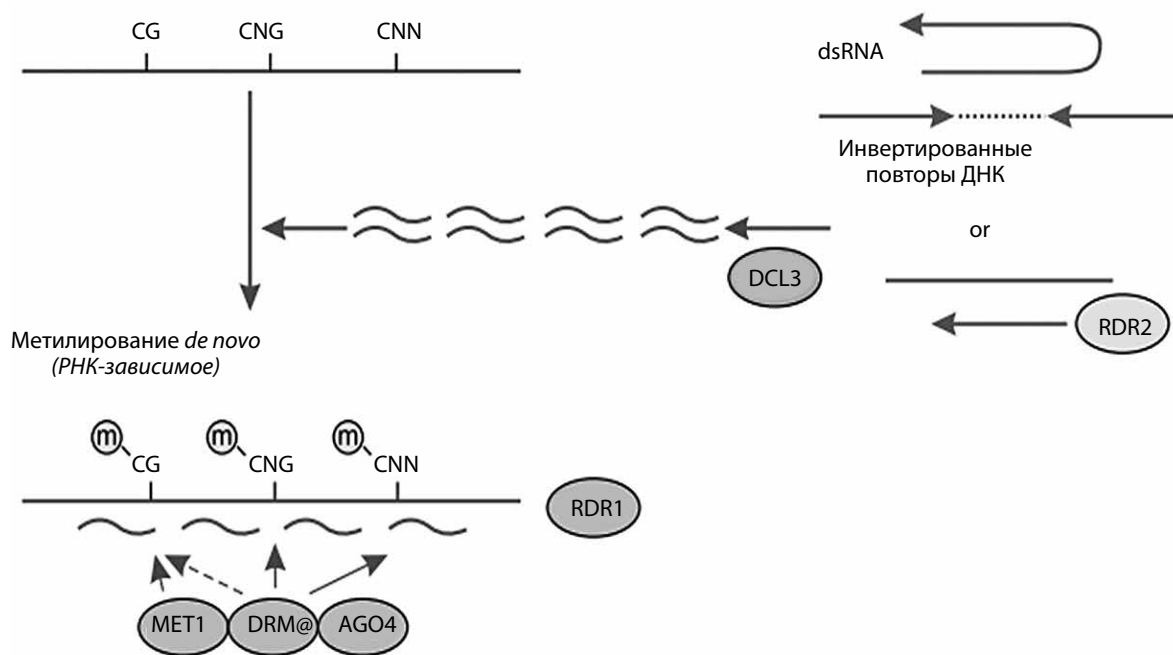


Рис. 5. Подавление экспрессии генов малыми интерферирующими РНК (siRNA). Из инвертированных повторов ДНК образуются двуцепочечные РНК. RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase 2) – РНК-зависимая ДНК-полимераза 2; DCL3 (dicer-like 3) – Dicer-подобный фермент-2, который разрезает длинные молекулы двуцепочечной РНК (dsRNA) на короткие фрагменты порядка 21–25 нуклеотидов, называемых siРНК, вызывающие сайтспецифическое de novo метилирование нуклеотидов молекулы ДНК с помощью ферментов метилтрансфераз (метилтрансферазы 1 (MET1), метилтрансферазы перегруппировки доменов 2 (domains rearranged methyltransferase, DRM2) и белка-аргонаута (AGO4) (адаптировано из [41])

Общебиологическое явление программированного метилирования определяется гормональным контролем. При этом глобальные перестройки происходят в период полового созревания [41]. С учетом инициирования опухолевого процесса при НФ1 главным образом в пубертатный период роль метилирования в данном отношении наиболее очевидна. Перспективы исследования характера метилирования промотора *NF1* при НФ1 и его роли в патогенезе заболевания связаны с возможностью специфического деметилирования и, таким образом, ингибирования опухолевой трансформации. Метилирование ДНК может существенно модулироваться различными биологическими (вирусами, бактериями, грибами, паразитическими растениями) и абиотическими (стрессами) факторами. Так, ингибитор метилирования ДНК 5-азациитидин уже используется для лечения рака кожи [41]. Поэтому программа по возможному нахождению терапевтических моделей регуляции метилирования вполне осуществима. Однако перспективно использование молекул, максимально специфично взаимодействующих с промоторной областью конкретного гена, так как описаны случаи, когда химиотерапия с применением гипометилирующих агентов (азациитидина и децитабина) приводила к развитию тяжелого миокардита [40].

У животных и растений существует связь между метилированием ДНК и деацетилизацией гистонов. Например, ген гистоновой деацетилазы необходим для метилирования ДНК, индуцированной малыми РНК (dsRNA). Большой интерес привлекает изучение

механизмов и биологической роли метилирования ДНК, направляемой малыми РНК, которые осуществляют специфическое выключение генов (сайленсинг). Сайтспецифичные ДНК-метилтрансферазы в присутствии малых сигнальных РНК осуществляют de novo метилирование ДНК по CNG и другим сайтам нуклеотидной последовательности ДНК, узнаваемой малой РНК (рис. 5). Метилирование ДНК играет решающую роль в подавлении экспрессии генов малыми РНК [41].

Исследование микроРНК в патогенезе нейрофиброматоза 1-го типа

МикроРНК имеют важное значение в регуляции канцерогенеза. Различные типы образований и опухоли на разных стадиях показывают уникальные профили микроРНК [22]. Одним из первых сообщений об ассоциации микроРНК с канцерогенезом человека стала публикация G.A. Calin и соавт. (2002) о *hsa-miR-15a* и *hsa-miR-16-1*, делетированных в 70 % опухолевых клеток у больных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом. Трансгенная экспрессия *hsa-miR-15a* и *hsa-miR-16-1* приводила к снижению уровней белка В-клеточного лейкоза и индукции апоптоза в лейкоэмических клеточных линиях [22, 45]. С момента открытия микроРНК около 24 лет назад обнаружена их важная роль в развитии рака, в том числе НФ1-ассоциированных опухолей. С момента открытия микроРНК, им посвящено более 60 000 научных публикаций, около половины которых о роли микроРНК в онкогенезе. У человека открыто около 2000 уникальных микроРНК,

Таблица 4. МикроРНК, ингибирующие экспрессию гена *NF1*

Источник	МикроРНК	Объект исследования
[47]	miR-21, miR-29c, miR-34a, miR-204	Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов
[8, 21, 47]	miR-10b	Злокачественные опухоли из оболочек периферических нервов, нейрофибромы
[48]	miR-370	Лейкоциты при остром миелолейкозе
[9]	miR-193b	Плоскоклеточный рак головы и шеи
[50]	miR-514a	Меланома
[49]	miR-128, miR-137	Клетки головного мозга здорового человека
[49]	miR-103	Любые клетки здорового человека

и число их растет. Изменение уровней специфических микроРНК выявлено почти во всех типах злокачественных новообразований, включая рак легкого, толстой кишки, поджелудочной и молочной железы и лейкоз [46]. Сейчас очевидно, что микроРНК регулируют экспрессию не менее 30 % всех белоккодирующих генов в геномах млекопитающих. Потенциальная роль микроРНК в патологии изучена не только при определении их однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), но и по вариациям числа их копий (CNV). МикроРНК играют ключевую роль в развитии рака влиянием на гены-онкосупрессоры. Более 50 % микроРНК локализуются в ассоциированных с раком областях или ломких участках хромосом [47].

Специфические микроРНК могут служить альтернативой LOH гена *NF1* в регуляции туморогенеза при НФ1 [8]. Несколько исследовательских групп изучили роль микроРНК в возникновении НФ1-ассоциированных злокачественных заболеваний. Из них напрямую вовлечены в туморогенез злокачественного перерождения при НФ1: miR-10b, miR-21, miR-29c, miR-34a, miR-204 [47]. В исследованиях G. Chai были определены профили микроРНК для *NF1* в опухолевых тканях и клеточных линиях. Выявлена усиленная регуляция miR-10b в шванноцитах MPNST, а также нейрофибром при НФ1 [8, 21].

Функциональный анализ показал, что ген *NF1* является непосредственной мишенью miR-370, гиперэкспрессия которого дает аналогичные с *NF1*-инактивацией эффекты, усиливая пролиферацию и образование колонии клеток острого миелолейкоза [48]. На уровень экспрессии нейрофибромина оказывают влияние miR-103, miR-128 и miR-137 путем специфического связывания с 3'-концом белка. При этом miR-103 экспрессируется во всех тканях организма, тогда как miR-128 и miR-137 — только в головном мозге. Экспрессия данных трех микроРНК на самом высоком уровне регистрируется в нейронах, на самом низком — в шванноцитах. Избыточная экспрессия этих микроРНК значительно снижает уровень эндогенного нейрофибромина, тогда

как антисмысловое ингибирование данных микроРНК усиливает его трансляцию [49].

Обнаружено подавление *NF1* посредством miR-193b, гиперэкспрессия которого наблюдается при спорадическом плоскоклеточном раке головы и шеи, приводящее к активации ERK и прогрессии опухоли [9]. В исследованиях M.S. Stark и соавт. подтверждено, что *NF1* является непосредственной мишенью miR-514a. Гиперэкспрессия miR-514a в клеточной линии меланомы ингибирует экспрессию *NF1* [50].

Изучение влияния микроРНК на ген *NF1* в туморогенезе при НФ1, а также при спорадических злокачественных опухолях имеет большое значение. Так, в исследованиях G. Chai и соавт. показана возможность использования антисмыслового ингибирования miR-10b для восстановления экспрессии нейрофибромина клеточной линии саркомы SK-ES-1 и подавления зависимой от нейрофибромина RAS-активности в клетках MPNST при НФ1 [8]. В апреле 2013 г. начаты клинические испытания противоопухолевой терапии микроРНК-препарата MRX34 — липосомсвязанной мимичной miR-34 для лечения больных гепатоцеллюлярной карциномой [51].

В табл. 4 представлены накопленные данные об ингибирующем влиянии микроРНК на экспрессию *NF1*. Эти микроРНК могут служить альтернативой LOH для гена *NF1* в регуляции туморогенеза при НФ1.

Сегодня возлагаются большие надежды на использование специфических микроРНК в терапии рака и других болезней. Это преимущественно связывают с направленным ингибированием активности генов, отвечающих за раковую трансформацию клеток и метастазирование [41]. Поскольку *NF1* играет значительную роль в опухолевой трансформации как при НФ1-ассоциированных, так и при спорадических злокачественных новообразованиях, исследование роли микроРНК в патогенезе данных процессов является перспективной и социально значимой задачей.

Кроме того, выявлена значительная роль длинных некодирующих РНК (long non-coding RNA, lncРНК) для активации критических регуляторов в развитии

опухолей при НФ1. В качестве гена-модификатора *NF1* может служить ген лнсРНК *ANRIL*, оказывающий существенное влияние на формирование плексиформных нейрофибром при НФ1. В работе E. Pasmant и соавт. обнаружена статистически значимая ассоциация однонуклеотидного полиморфизма *rs2151280*, расположенного в *ANRIL*, с количеством плексиформных нейрофибром у больных НФ1 [52]. Однако в исследовании T. Mubotter и соавт. у больных НФ1 с микроделециями *NF1* не выявлено ассоциации плексиформных нейрофибром с *rs2151280*. лнсРНК *ANRIL* напрямую связывается с белком *SUZ12*, важным участником многокомпонентного репрессивного комплекса-2, и необходим для использования *SUZ12* генами-онкосупрессорами *CDKN2A/CDKN2B*, а также для их эпигенетического подавления. Т-аллель *rs2151280*, коррелирующий с редуцированной экспрессией *ANRIL*, ассоциирован с большим количеством плексиформных нейрофибром [53]. лнсРНК *ANRIL* идентифицирована в качестве онкогена, вовлеченного в развитие ряда опухолей, таких как рак желудка, легкого, гепатоцеллюлярная карцинома и плоскоклеточный рак пищевода. Ингибирование *ANRIL* подавляет пролиферацию, миграцию и инвазию раковых клеток [54]. Предполагается, что исследование роли лнсРНК имеет важное значение в фармакокоррекции опухолевого синдрома при НФ1, в частности путем модуляции экспрессии *ANRIL* [50]. Кроме того, *ANRIL* может выступать в качестве диагностического и прогностического биомаркера некоторых опухолей [52] и быть использован для прогнозирования течения опухолевого синдрома при НФ1.

Заключение

НФ1 — одно из самых распространенных наследственных заболеваний с частотой встречаемости 1:3,0–3,5 тыс. населения в мире [1–4]. Причиной возникновения НФ1 являются мутации в онкосупрессорном гене *NF1*, отличающиеся чрезвычайно высокой мутабельностью — доля спорадических случаев составляет 50 %, в связи с чем с учетом сохраненной способности к деторождению больных, распространенность НФ1 в мире

неуклонно возрастает. В настоящее время не существует эффективных способов лечения опухолевого синдрома при НФ1, нередко иссечение опухолей провоцирует диссеминацию опухолевого процесса и развитие рецидивов. Возникающие злокачественные новообразования при НФ1 проявляют высокую стойкость к химиотерапии [6]. Кроме того, мутации в гене *NF1* играют важную патогенетическую роль в спорадическом канцерогенезе [6, 9, 38, 39]. Предполагается, что в инактивации второго аллеля гена *NF1* в опухолях при НФ1 и в инактивации обоих аллелей *NF1* в спорадических неоплазмах большое значение имеют эпигенетические факторы. На роль эпигенетических факторов в патогенезе НФ1 указывает отсутствие в большинстве опубликованных исследований гено-фенотипических корреляций даже у членов одной семьи с идентичной мутацией [13], а также особенности гена *NF1* (большие размеры гена — 280 кб, 57 экзонов; наличие нескольких функционирующих альтернативных сплайсинговых транскриптов [23]; наличие 11 псевдогенов *NF1* [10], высокий темп мутирования гена *NF1* [4, 25]; наличие в гене *NF1* «горячих точек» для инсерции L1-элементов [26]; развитие большинства нейрофибром в пубертатном периоде, расположение промотора гена в CpG-богатой области [30], разные уровни экспрессии *NF1* в различных тканях и на различных этапах и в разном возрасте [10]). Исследование роли эпигенетических факторов в патогенезе НФ1 позволило выявить специфическое изменение характера метилирования промоторной области гена *NF1* в НФ1-ассоциированных опухолях [31, 42–44], а также обнаружить вовлечение в канцерогенез злокачественных новообразований микроРНК miR-10b, miR-21, miR-29c, miR-34a, miR204 [8, 21, 47], miR-370 [48] при НФ1 и в спорадических случаях miR-193b [9], miR-514a [50]. Перспективы изучения роли эпигенетических факторов в патогенезе НФ1 позволяют надеяться на возможности таргетной терапии опухолевого синдрома при данном заболевании, а также при спорадических злокачественных новообразованиях. В эксперименте успешно применено антисмысловое ингибирование miR-10b в клеточных линиях злокачественных опухолей при НФ1 [8].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Duong T., Sbidian E., Valeyrie-Allanore L. et al. Mortality associated with neurofibromatosis 1: a cohort study of 1895 patients in 1980–2006 in France. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:18–26.
- Gregorian C., Nakashima J., Dry S. et al. PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation. *PNAS* 2009;106(46):19479–84.
- Melean G., Hernandez A.M., Valero M.C. et al. Monozygotic twins with neurofibromatosis type 1, concordant phenotype and synchronous development of MPNST and metastasis. *BMC Cancer* 2010;10:407–12.
- Ponti G., Losi L., Martotana D. et al. Clinico-pathological and biomolecular findings in Italian patients with multiple cutaneous neurofibromas. *Hered Cancer in Clin Pract* 2011;9:6–15.
- Brinkman J., Bron J., Wuisman P. et al. The correlation between clinical, nuclear and histologic findings in a patient with Von Recklinghausen's disease. *World J Surg Oncol* 2007;5:130–7.
- Laycock-van Spyk S., Thomas N., Cooper D., Upadhyaya M. Neurofibromatosis type 1-associated tumours: their somatic mutational spectrum and pathogenesis. *Hum Genomics* 2011;5(6):623–90.
- Patil S., Chamberlain R.S. Neoplasms associated with germline and somatic *NF1* gene mutations. *Oncologist* 2012;17(1):101–16.
- Chai G., Liu N., Ma J. et al. MicroRNA-10b regulated tumorigenesis in neurofibromatosis type 1. *Cancer Sci* 2010;101(9):1997–2004.
- Yap Y.S., McPherson J.R., Ong C. et al. The NF1 gene revisited — from bench to bedside. *Oncotarget* 2014;5(15):5873–92.

10. Vandenbrucke I. Identification and characterization of neurofibromatosis type 1 splice variants. 2004.
11. Дрозд О.В., Бабенко О.В., Семьячкина А.Н. и др. Разработка подходов к ДНК-диагностике нейрофиброматоза 1-го типа в России. Медицинская генетика 2005;4(7):322–6. [Drozd O.V., Babenko O.V., Semyachkina A.N. et al. Development of approaches to DNA diagnostics of type 1 neurofibromatosis in Russia. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2005;4(7):322–6. (In Russ.)].
12. Мустафин Р.Н., Бермисева М.А., Хуснутдинова Э.К. Особенности нейрофиброматоза 1-го типа в Республике Башкортостан. Медицинская генетика 2015;14(6):29–35. [Mustafin R.N., Bermisheva M.A., Khusnutdinova E.K. Features of type 1 neurofibromatosis in the Republic of Bashkortostan. Meditsinskaya genetika = Medical Genetics 2015;14(6):29–35. (In Russ.)].
13. Ratner N., Miller S.J. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. Nat Rev Cancer 2015;15(5):290–301.
14. Sabbagh A., Pasmant E., Laurendeau I. et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. Hum Mol Gen 2009;18(18):2768–78.
15. Eisenbarth I., Beyer K., Krone W., Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. Am J Hum Genet 2000;66(2):393–401.
16. Stevenson D.A., Zhou H., Ashrafi S. et al. Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. Am J Hum Genet 2006;79(1):143–8.
17. Boyd K.P., Korf B.R., Theos A. Neurofibromatosis type 1. J Am Acad Dermatol 2009;61(1):1–16.
18. McGillicuddy L.T., Fromm J.A., Hollstein P.E. Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. Cancer Cell 2009;16(1):44–54.
19. Gutmann D.H., Giovannini M. Mouse models of neurofibromatosis 1 and 2. Neoplasia 2002;4(4):279–90.
20. Hawes J.J., Tuskan R.G., Reilly K.M. Nf1 expression is dependent on strain background: implications for tumor suppressor haploinsufficiency studies. Neurogenetics 2007;8(2):121–30.
21. Jouhilahti E.M., Peltonen S., Heape A.M., Peltonen J. The pathoetiology of neurofibromatosis 1. Am J Pathol 2011;178(5):1932–9.
22. Huppi K., Volfovsky N., Mackiewicz M. et al. MicroRNAs and genomic instability. Semin Cancer Biol 2007;17(1):65–73.
23. Bottillo I., Luca A., Schirrinzi A. et al. Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. BMC Med Genet 2007;8:4–13.
24. Zhou H., Hinman M., Barron V. et al. Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. PNAS 2007;108(36):627–35.
25. Горбунова В.Н., Имянитов Е.Н., Ледашева Т.А. и др. Молекулярная неврология. Часть III. Опухоли головного мозга, онкогены и антионкогены. Под ред. А.А. Скоромца. СПб.: Интермедика, 2004. С. 219–232. [Gorbunova V.N., Imyanitov E.N., Ledashcheva T.A. et al. Molecular neurology. Part III. Tumors of the brain, oncogenes and anti-oncogenes. Ed. A.A. Skoromets. Saint Petersburg: Intermedika, 2004. Pp. 219–232. (In Russ.)].
26. Wimmer K., Callens T., Wernstedt A., Messiaen L. The NF1 gene contains hotspots for L1 endonuclease-dependent *de novo* insertion. PLoS Genet 2011;7(11):e1002371.
27. Ayarpadikannan S., Lee H.E., Han K., Kim H.S. Transposable element-driven transcript diversification and its relevance to genetic disorders. Gene 2015;558(2):187–94.
28. Патрушев Л.И., Минкевич И.Г. Проблема размера геномов эукариот. Успехи биологической химии 2007;47:293–370. [Patrushev L.I., Minkevich I.G. The problem of the size of the genomes of eukaryotes. Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry 2007;47:293–370. (In Russ.)].
29. Козлов В.А. Метилирование ДНК клетки и патология организма. Медицинская иммунология 2008;10(4):307–18. [Kozlov V.A. Methylation of cell DNA and pathology of the body. Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology 2008;10(4):307–18. (In Russ.)].
30. Jeong S.Y., Park S.J., Kim H.J. The spectrum of NF1 mutations in Korean patients with neurofibromatosis type 1. J Korean Med Sci 2006;21(1):107–12.
31. Fishbein L., Eady B., Sanek N. et al. Analysis of somatic NF1 promoter methylation plexiform neurofibromas and Schwann cells. Cancer Genet Cytogenet 2005;157(2):181–6.
32. Garcia-Linares C., Fernandez-Rodriguez J., Terribas E. et al. Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: importance of copy neutral LOH. Hum Mutat 2011;32(1):78–90.
33. De Raedt T.D., Maertens O., Chmara M. et al. Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. Genes Chromosomes Cancer 2006;45(10):893–904.
34. Stewart D.R., Pemov A., van Loo P. et al. Mitotic recombination of chromosome arm 17q as a cause of loss of heterozygosity of NF1 in neurofibromatosis type 1-associated glomus tumors. Genes Chromosomes Cancer 2012;51(5):429–37.
35. Geller M., Ribeiro M.G., Araújo A.P. et al. Serum IgE levels in neurofibromatosis 1. Int J Immunogenet 2006;33(2):111–5.
36. Chen S., Burgin S., McDaniel A. et al. NF1-/- schwann cell-conditioned medium modulates mast cell degranulation by c-Kit-mediated hyperactivation of phosphatidylinositol 3-kinase. Am J Pathol 2010;177(6):3125–32.
37. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome 2013;14(10):115.
38. Nissan M.H., Pratilas C.A., Jones A.M. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. Cancer Res 2014;74(8):2340–50.
39. Holzel M., Huang S., Koster J. et al. NF1 is a tumor suppressor in neuroblastoma that determines retinoic acid response and disease outcome. Cell 2010;142(2):218–29.
40. Рунов А.Л., Вонский М.С., Михельсон В.М. Уровень метилирования ДНК и длина теломер как основа для построения модели биологических часов старения. Цитология 2015;57(3):192–6. [Runov A.L., Vonskiy M.S., Mikhel'son V.M. The level of DNA methylation and the length of telomeres as a basis for constructing a model of biological aging hours. Tsitologiya = Cytology 2015;57(3):192–6. (In Russ.)].
41. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра. Вавиловский журнал генетики и селекции 2013;17(4/2):805–32. [Vanyushin B.F. Epigenetics today and tomorrow. Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding 2013;17(4/2):805–32. (In Russ.)].
42. Horan M.P., Cooper D.N., Upadhyaya M. Hypermethylation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promoter is not a common event in the inactivation of the NF1 gene in NF1-specific tumours. Hum Genet 2000;107(1):33–9.
43. Harder A., Rosche M., Reuss D.E. et al. Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) promoter in peripheral nerve sheath tumors. Eur J Cancer 2004;40(18):2820–8.
44. Gutmann D.H., McLellan M.D., Hussain I. et al. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. Genome Res 2013;23(3):431–9.
45. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(24):15524–9.
46. Gozuacik D., Akkoc Y., Ozturk D.G., Kocak M. Autophagy-regulating microRNAs and cancer. Front Oncol 2017;7:65.

47. Sedani A., Cooper D.N., Upadhyaya M. An emerging role for microRNAs in NF1 tumorigenesis. *Human Genomics* 2012;6:23–32.
48. Garcia-Orti L., Cristobal I., Cirauqui C. et al. Integration of SNP and mRNA arrays with microRNA profiling reveals that miR-370 is upregulated and targets NF1 in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2012;7(10):e47717.
49. Paschou M., Doxakis E. Neurofibromin 1 is a miRNA target in neurons. *PLoS One* 2012;7(10):e46773.
50. Stark M.S., Bonazzi V.F., Boyle G.M. et al. MiR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 2015;6(19):17753–63.
51. Ling H., Fabbri M., Calin G.A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(11):847–65.
52. Pasmant E., Sabbagh A., Masliah-Planchon J. et al. Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(22):1713–22.
53. Mubotter T., Kluwe L., Hogel J. et al. Non-coding RNA ANRIL and the number of plexiform neurofibromas in patients with NF1 microdeletions. *BMC Med Genet* 2012;13:98.
54. Li Z., Yu X., Shen J. ANRIL: a pivotal tumor suppressor long non-coding RNA in human cancers. *Tumour Biol* 2016;37(5):5657–61.

Секретируемый белок YB-1 и его прогностическая значимость

А.А. Ставровская¹, Н.И. Моисеева¹, Г.П. Генс², Е.Ю. Рыбалкина¹

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

²ФГБОУ ВО «Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, ул. Дедегатская, 20, стр 1

Контакты: Наталья Ивановна Моисеева N.I.Moiseeva@gmail.com

Многофункциональный белок YB-1 (*Y box-binding protein 1*) в клетках прокариот и эукариот участвует в различных процессах, среди других выполняя функции регулятора транскрипции и трансляции многих генов. Внутриклеточная локализация и экспрессия YB-1 является признанным прогностическим маркером для некоторых злокачественных новообразований. Однако относительно недавно стало понятно, что YB-1 может выделяться из клеток и присутствует в жидкостях организма, в том числе находясь внутри везикул. В обзоре собраны данные относительно содержания секретируемого YB-1 (сYB-1) в сыворотке крови у больных с воспалительными заболеваниями и различными опухолями. Изучается влияние сYB-1 на нормальные и опухолевые клетки. Рассматриваются данные, показывающие, что внутриклеточный YB-1 и сYB-1 по-разному влияют на клетки. Обсуждается прогностическая значимость сYB-1 и его формы YB-1/p18 при злокачественных новообразованиях.

Ключевые слова: секретируемый YB-1, YB-1/p18, биологический маркер опухоли, SASP

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-50-56

Secreted protein YB-1 and its prognostic significance

A.A. Stavrovskaya¹, N.I. Moiseeva¹, G.P. Guens², E. Yu. Rybalkina¹

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

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

The multifunctional protein YB-1 in prokaryotes and eukaryotes participates in various processes, among others performing the functions of a regulator of transcription and translation of many genes. Intracellular localization and expression of YB-1 is an acknowledged prognostic marker for certain malignant tumors. However, it has recently become clear that YB-1 can be released from cells and present in body fluids, including inside vesicles. The review collected data on the secretion YB-1 (sYB-1) content in blood serum from patients with inflammatory diseases and various tumors. There is analyzed the influence of sYB-1 on normal and tumor cells. Data are presented that show that intracellular YB-1 and sYB-1 affect cells differently. The prognostic significance of sYB-1 and its form YB-1/p18 in malignant neoplasms is discussed.

Key words: secreted YB-1, YB-1/p18, biological tumor marker, SASP

Введение

Данный обзор посвящен секретируемому белку YB-1 (secreted Y box-binding protein 1, сYB-1). Однако основные сведения относительно участия этого белка в процессах канцерогенеза и опухолевой прогрессии получены при изучении внутриклеточного белка YB-1, поэтому сначала остановимся на его значении для жизнедеятельности клетки, связанном с его цитоплазматической и ядерной локализацией. YB-1 — многофункциональный белок, принадлежащий к суперсемейству белков, обладающих эволюционно консервативным доменом холодового шока (CSD), взаимодействующих с ДНК и РНК клетки [1, 2].

Интерес к YB-1 и его внутриклеточной локализации начался с работы R.C. Vargou и соавт. в 1997 г., в которой было показано, что YB-1 является транскрипционным фактором для гена *MDR1*, кодирующего белок Р-гликопротеин, основного АВС-транспортера, ответственного за множественную лекарственную устойчивость [3]. С этого момента количество работ, посвященных YB-1 как в связи с множественной лекарственной устойчивостью [4, 5], так и с другими аспектами опухолевой прогрессии постоянно возрастало. Показано, что YB-1 участвует в регуляции многих клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и ответ на стрессовые воздействия [6, 7].

Взаимодействуя с ДНК и РНК, YB-1 функционирует как в цитоплазме, так и в клеточном ядре. Связываясь с ДНК в ядре клетки, YB-1 выполняет функции фактора транскрипции и осуществляет положительную и отрицательную модуляцию транскрипции широкого ряда генов, а также модификацию хроматина [6, 7]. YB-1 проявляет свойства шаперона нуклеиновых кислот и взаимодействует с большим количеством других белков. Взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, YB-1 принимает участие практически во всех процессах, зависящих от ДНК и матричной РНК (мРНК), включая репликацию и репарацию ДНК, транскрипцию, сплайсинг и трансляцию мРНК [8–10]. Он упаковывает и стабилизирует мРНК и осуществляет глобальную и специфическую регуляцию экспрессии генов на различных уровнях [7, 11].

Содержание этого белка значительно возрастает в клетках злокачественных опухолей различного гистогенеза (по сравнению с соответствующими нормальными тканями). Показано, что внутриклеточный YB-1 принимает участие в регуляции практически всех основных процессов малигнизации, включая активацию инвазии и метастазирования, нарушения регуляции размножения клеток, снижения способности к апоптозу [6, 7]. Таким образом, очевидно, что внутриклеточный YB-1 – важный участник канцерогенеза и опухолевой прогрессии.

Следует подчеркнуть, что в исследованиях прогностической значимости внутриклеточного YB-1 при онкологических заболеваниях показано, что уровень экспрессии гена *YB-1* в опухолевых клетках является четким и независимым от молекулярно-биологических подтипов опухолей фактором прогноза рака молочной железы (РМЖ). Высокая экспрессия этого гена ассоциирована с ухудшением показателя безрецидивной выживаемости больных РМЖ [12], а также больных с другими новообразованиями [13, 14]. Кроме того, белок YB-1 является потенциальной мишенью для таргетной терапии [15]. Однако существует не только внутриклеточный YB-1, но и белок сYB-1, который может циркулировать в крови.

Секретируемый YB-1 и его роль в организме

Белок сYB-1 при воспалении. Впервые в работе В.С. Фруге и соавт. было показано, что YB-1 выделяется из клеток, в частности из мезангиальных, и моноцитов (находясь внутри микровезикул), в ответ на добавление индуктора воспаления – липополисахарида [16]. Белок сYB-1 связывался с рецептором Notch-3 на поверхности клеток-мишеней [17] и активировал сигнальный путь, контролируемый рецептором Notch-3, в результате чего Notch-3 перемещался в ядра клеток-мишеней, где происходила активация генов, контролируемых Notch-3, а экспрессия гена *Notch-3* возрастала [17, 18]. Авторы этих работ выдвинули гипотезу, постулирующую: 1) ауторегуляцию количества YB-1: вслед за активацией экспрессии YB-1 такими стимуляторами,

как PDGF- β , тромбин или интерферон- γ , YB-1 начинает регулировать свою собственную транскрипцию; 2) функционирование YB-1 в качестве компонента мРНК (мессенджерного рибонуклеинового комплекса), определяющего синтез интерлейкина 2 при активации Т-клеток; 3) участие YB-1 в осуществлении фенотипических эффектов TGF- β ; 4) влияние YB-1 на передачу сигнала через рецептор Notch-3.

Повышение транскрипционной активности внутриклеточного YB-1 в результате воздействия сYB-1 может привести к усилению воспалительных реакций. Показано, что внутриклеточный YB-1 регулирует экспрессию многих белков, участвующих в воспалительных реакциях. К ним относятся факторы роста PDGF- β , VEGF1, интерлейкин 2, GM-CSF, TGF- β , некоторые из их рецепторов, а также белки, имеющие отношение к клеточному матриксу (MMP-2, коллаген 1-го и 2-го типов, некоторые антигенпрезентирующие или участвующие в адгезии клеток молекулы). YB-1 участвует в регуляции экспрессии CCL5 (RANTES) – важного хемокина, секретируемого нормальными Т-клетками и являющегося существенным звеном процессов воспаления [19, 20].

Белок сYB-1 при канцерогенезе и опухолевой прогрессии. Воспаление, процессы канцерогенеза и опухолевой прогрессии тесно связаны. Молекулы, регулируемые YB-1, вовлечены в регуляцию воспаления в тканях опухолей. К числу этих молекул принадлежат EGFR, ERBB2, STAT3, mTOR, MMP-2, CCL5 и CD44 [7]. Все эти молекулы также могут принимать участие в процессах эволюции опухолевых клонов. В этой взаимосвязи важная роль принадлежит и YB-1 [7].

Влияние сYB-1 на размножение клеток. Показано, что сYB-1 стимулирует размножение клеток-мишеней. На линии клеток почки человека (НК-2) и крысиных моноцитах было обнаружено увеличение уровня синтеза ДНК при добавлении рекомбинантного YB-1 по сравнению с «голодающими» клетками на 90 и 40 % соответственно, в то время как в положительном контроле (10 % fcs) этот уровень составил 35 и 60 % соответственно [16]. Мы исследовали влияние сYB-1, полученного рекомбинантным методом, на пролиферацию 3 линий клеток РМЖ человека (MCF-7, BT-474 и HBL-100) [21]. При добавлении сYB-1 к клеткам РМЖ уровень их пролиферации достоверно увеличивался на 10–40 %, но степень увеличения и сроки, в которые наблюдалось влияние сYB-1 на пролиферацию, были разными для различных линий опухолевых клеток. Под действием сYB-1 в клетках линии MCF-7 наблюдалось перемещение Notch-3 с мембраны в периядерное пространство. Таким образом, пролиферативный эффект сYB-1 существует, но зависит от контекста клеток-мишеней.

Аналогичная работа проведена другим коллективом авторов, которые показали, что добавление в среду сYB-1 приводит к усилению пролиферации, инвазии

и метастазирования клеток НерG2, и он также связывается с Notch-3 [22].

Влияние сYB-1 на подвижность и устойчивость клеток. Продемонстрировано влияние сYB-1 на подвижность мезангиальных клеток (клеток почечных клубочков). Авторы наблюдали стимуляцию заживления «раны», нанесенной на монослой, под влиянием сYB-1 [16]. В клеточной линии РМЖ человека HBL-100 нами также обнаружена тенденция к более быстрому закрытию «раны» при добавлении сYB-1. Однако в клеточной линии MCF-7 того же гистогенеза этого не наблюдалось. Таким образом, и данный эффект сYB-1 существует, но зависит от контекста клеток-мишеней (если речь идет об опухолевых клетках).

Одна из важных функций внутриклеточного белка YB-1 в клетке — участие в регуляции ответа на стрессовые воздействия окружающей среды (цитотоксические препараты, облучение и др.) и увеличение экспрессии генов семейства ABC-транспортёров, обуславливающих множественную лекарственную устойчивость [4, 23]. Вопрос заключается в том, участвует ли сYB-1 в развитии устойчивости к химиопрепаратам. Выживаемость клеток 3 исследуемых линий (MCF-7, HBL-100 и BT-474) оценивали при воздействии нескольких препаратов, относящихся к разным группам по механизму их действия [21]. Наши опыты показывают, что сYB-1 не повышает устойчивость клеток к большинству химиопрепаратов, используемых при лечении РМЖ, существует даже некоторая тенденция к небольшому снижению устойчивости (на 5–8 % по сравнению с контролем). Таким образом, по крайней мере в этом состоит отличие эффектов внутриклеточного YB-1 и сYB-1.

Паттерны экспрессии под действием сYB-1. Группа авторов, изучавших активность сYB-1 при болезнях почек, выдвинула гипотезу о том, что сYB-1 при нефритах принимает участие в ауторегуляторном цикле этого белка, способствуя переходу внутриклеточного YB-1 в ядра клеток, что повышает его транскрипционную активность, которая приводит к активации генов, кодирующих PDGF- β и интерферон- γ [17]. Авторы считают, что YB-1 является важным регулятором процессов воспаления, влияющим на экспрессию цитокинов и их рецепторов, белков клеточного матрикса и другие белки клеточной адгезии.

По нашим данным, влияния сYB-1 и внутриклеточного YB-1 на активность генов опухолевых клеток существенно различаются [21]. Чтобы оценить воздействие сYB-1 на профиль экспрессии генов в клетках культуры MCF-7, мы использовали биочипы. При высоком уровне достоверности ($p = 0,01$) через 6 ч после добавления сYB-1 изменений в генной активности не наблюдалось. Через 24 ч экспрессия 39 генов снизилась на 65–85 % от исходного уровня. При разделении на функциональные группы можно отметить, что изменилась экспрессия 4 генов, ответственных за апоптоз (*EBAG9*, *GLO1*, *PDCD6*, *PTRH2*), 5 генов,

ответственных за адгезию клеток и организацию цитоскелета (*GPR56*, *PTPRF*, *RPSA*, *SCARB2*, *KIAA1598*). Также снижение экспрессии наблюдалось для генов, участвующих в регуляции пролиферации (*DNAJA2*) и продвижении по клеточному циклу (*GMNN*, *PSMB1*, *TFDPI*), и 6 генов, ответственных за транскрипцию. Таким образом, сYB-1 снизил число мРНК генов, вовлеченных в контроль важнейших клеточных процессов. Он тормозил активность различных генов в клетках MCF-7. В результате трансфекции комплементарной ДНК гена *YB-1* в эти клетки активность разных групп генов, наоборот, возрастала. Таким образом, складывается мнение о том, что влияние сYB-1 на нормальные клетки почек и клетки опухолей человека различно. Однако для окончательного вывода требуются дальнейшие исследования.

Секретируемый YB-1 как прогностический маркер при различных заболеваниях

Определение фрагмента YB-1/p18 в сыворотке крови. Через 2 года после открытия активной роли сYB-1 появилась первая работа по оценке клинической значимости белка сYB-1 и его фрагментов в сыворотке крови пациентов с воспалительными и онкологическими заболеваниями. Авторы обнаружили фрагмент сYB-1 с молекулярной массой 18 кДа, который появлялся у больных раком легкого, но не у здоровых доноров. Этот фрагмент был назван YB-1/p18, и было показано, что он является частью домена холодового шока YB-1 [24]. Далее авторы определяли YB-1/p18 в сыворотке крови у больных с опухолями различного гистогенеза (легкого, РМЖ, гемобластозы и др.) и воспалительными заболеваниями и обнаружили его у 87 % (32/37) пациентов с опухолями легких, у 70 % (7/10) больных РМЖ, у 68 % (42/62) пациентов с гемобластозами. При этом YB-1/p18 не выявлялся в сыворотке крови 33 здоровых лиц, хотя и был найден у 10 (17 %) из 60 пациентов группы неонкологических заболеваний.

На этой же выборке больных авторы сравнили диагностическую ценность YB-1/p18 с 13 известными маркерами онкологических заболеваний, такими как СА 15–3, 19–9, 72–4 и 125; канцероэмбиональный антиген; альфа-фетопротеин и т.д. YB-1/p18 оказался наиболее чувствительным общим показателем для опухолей, но не был хорошим прогностическим фактором [25].

В последней работе этой же группы ученых с помощью иммуноферментного анализа была определена концентрация YB-1/p18 в крови здоровых доноров ($n = 132$) и больных раком яичников ($n = 206$, из них 91 % с III–IV стадией по FIGO) [26]. Результаты исследования показали, что у больных раком яичников концентрация YB-1/p18 в крови значительно ниже, чем у здоровых добровольцев ($p < 0,0001$). Авторы полагают, что происходит маскирование эпитопов фрагментом YB-1/p18 в мультибелковом комплексе и это приводит к снижению сигнала, детектируемом

с помощью ELISA. Тем не менее определение YB-1/p18 позволяет диагностировать рак яичников на ранних стадиях [26].

Таким образом, сывороточный YB-1/p18 с высокой частотой обнаруживался в сыворотке крови пациентов с различными онкологическими нозологиями и может рассматриваться как маркер неоплазий.

Определение полноразмерного сYB-1 в сыворотке. Кроме фрагмента YB-1/p18 в некоторых исследованиях определяют количество полноразмерного белка сYB-1 в сыворотке. Так, было проведено небольшое исследование по сравнению уровня сYB-1 у здоровых доноров ($n = 10$) и пациентов с эндометриозом ($n = 12$). Уровень сYB-1 оказался значительно выше у пациентов с эндометриозом ($p = 0,004$), а чувствительность и специфичность теста на основании сYB-1 составили 83,3 и 70,0 % соответственно [27].

Недавно разработан хемилюминисцентный иммунный тест на сYB-1, используемый для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы. Авторы показали, что комбинация сYB-1 + альфа-фетопротеин значительно повышает чувствительность теста: 74 % для сYB-1, 45 % для альфа-фетопротеина и 90 % для их комбинации [28].

Показано, что у больных РМЖ с метастазами в кости сYB-1 ассоциирован с более быстрым появлением внекостных отдаленных метастазов ($p = 0,04$), а также с быстрым прогрессированием костных мета-

стазов ($p = 0,03$). Кроме того, высокая экспрессия сYB-1 положительно коррелирует с экспрессией ин-терлейкина 6 [29].

Определение антител к сYB-1 в сыворотке. В сыворотке крови больных с первичным аутоиммунным циррозом печени были найдены аутоантитела к сYB-1 [30]. Опубликована диссертация, посвященная внеклеточному YB-1 при нейробластомах [31]. В этом исследовании в сыворотке крови больных с нейробластомами обнаружено повышенное количество аутоантител к сYB-1 и показано, что оно нарастает с прогрессированием заболевания.

Таким образом, сYB-1 или аутоантитела к нему обнаруживаются в сыворотке крови лиц с различными заболеваниями, с наиболее высокой частотой при злокачественных новообразованиях. Результаты ряда исследований сYB-1 у онкологических больных представлены в таблице.

YB-1 и секреторный фенотип клеточных популяций

Выделение сYB-1 из клеток может быть связано с секреторным фенотипом клеточных популяций. Термин «секреторный фенотип клеток, ассоциированный со старением» (senescence associated secretory phenotype, SASP), появился при изучении клеточного старения (КС). КС определяют как остановку клеточного деления, изменения морфологии клеток, изменения экспрессии генов и функций кодируемых ими белков [32].

Клинические исследования, посвященные определению сYB-1

сYB-1	Метод	Нозология	Результат	Год	Ссылка
Фрагмент YB-1/p18	Иммуноблоттинг	Воспалительные и онкологические заболевания	В сыворотке больных появляется фрагмент YB-1/p18 – потенциальный маркер для диагностики	2011	[24]
Фрагмент YB-1/p18	Иммуноблоттинг	Онкологические заболевания	YB-1/p18 обладает высокой специфичностью и может быть использован для скрининга онкологических заболеваний	2014	[25]
Фрагмент YB-1/p18	Иммуноферментный анализ (ELISA)	Рак яичника	YB-1/p18 – маркер раннего рака яичников	2016	[26]
Полноразмерный сYB-1	Хемилюминисцентный иммунный тест (CLIA)	Гепатоцеллюлярная карцинома	В комбинации с альфа-фетопротеином – диагностика	2013	[28]
Полноразмерный сYB-1	Иммуноблоттинг	Эндометриоз	сYB-1 – биомаркер наличия эндометриоза	2015	[27]
Полноразмерный сYB-1	Иммуноферментный анализ (ELISA)	Рак молочной железы	сYB-1 ассоциирован с низкой безрецидивной выживаемостью	2017	[29]
Аутоантитела к сYB-1	Иммуноферментный анализ (ELISA)	Нейробластома	Количество аутоантител к сYB-1 коррелирует со стадией заболевания	2012	[31]

Остановка деления клеток при КС связана с выраженными изменениями набора (паттерна) экспрессируемых генов (более 40), она сопровождается секрецией клетками многих цитокинов, факторов роста, протеаз, что и представляет собой SASP [33]. КС и ассоциированный с ним SASP рассматривали как ингибиторы опухолевого роста, поскольку стареющие опухолевые клетки перестают размножаться. Однако в последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что стареющие опухолевые клетки выделяют факторы, которые могут стимулировать канцерогенез и опухолевую прогрессию [32, 33]. Необходимо подчеркнуть, что SASP характерен как для человека, так и для мыши, он присущ клеткам разного гистогенеза (фибробlastам, эпителию, эндотелию, астроцитам и др.), т. е. SASP широко распространен [32, 34].

Постановка диагноза SASP важна, так как составляющие эксудата могут послужить промоторами усиления пролиферации и злокачественного перерождения эпителия. Секретируемые факторы могут стимулировать ангиогенез, запускать эпителиально-мезенхимальный переход, усиливать инвазию опухолевых клеток [32, 33]. Естественно, что появляются работы по диагностике SASP. Их цель – внедрение методов диагностики SASP в клиническую практику [35].

Может ли сУВ-1 входить в эксудат, выделяемый клетками при КС, т. е. быть составной частью SASP? Показано, что количество аутоантител к сУВ-1 повышено в сыворотке крови пациентов с нейробlastомами, и наибольшее их количество находят у больных, имеющих IV стадию заболевания, т. е. у леченых больных. Также обнаружено, что сУВ-1 определяется в кондиционированной среде, при культивации культур клеток нейробlastом [31]. Это свидетельствует о том, что клетки нейробlastом *in vivo* и *in vitro* секретируют белок УВ-1. Вполне вероятно, что этот феномен связан с КС, поскольку известно, что химиотерапия может индуцировать КС [35–37].

Влияет ли УВ-1 на КС, а соответственно на SASP? На культурах фибробlastов мышинных эмбрионов с генотипом *УВ-1*^{-/-} (нокаут по гену *УВ-1*) показано, что эти клетки уже через 12 ч культивирования переставали размножаться, их морфология изменялась (в характерную для стареющих клеток сторону), и они начинали экспрессировать маркер КС β-галактозидазу [36]. Это впервые свидетельствовало в пользу того, что УВ-1 может влиять на КС: при снижении экспрессии УВ-1 клетки стареют. Это позволяет предположить, что УВ-1 подавляет КС. В дальнейшем было обнаружено, что количество белка УВ-1 снижается в ходе пассирования мышинных эмбриональных фибробlastов в культуре, и это снижение коррелирует

с повышенной экспрессией гена – супрессора злокачественного роста *p16^{INK4A}*. Повышенная экспрессия УВ-1 приводила к усилению пролиферации мышинных клеток [38].

Некоторые данные свидетельствуют о том, что способность опухолевых клеток к секреции может быть связана с повышенным количеством внутриклеточного УВ-1. Показано, что клетки почки собаки линии MDCK, экспрессирующие УВ-1, более онкогенны по ряду признаков по сравнению с клетками, не экспрессирующими УВ-1 [39]. Анализ секретомы этих клеток и сравнение его с секретомом родительских (не экспрессирующих УВ-1 клеток) показали, что клетки УВ-1+ секретируют факторы, усиливающие ангиогенез [40]. Однако в данных работах использованы лишь единичные линии клеток. Неясно, насколько часто наблюдается связь повышенного количества внутриклеточного УВ-1 с повышенной секреторной функцией клеток.

Продемонстрировано, что УВ-1 регулирует синтез целого ряда цитокинов/хемокинов и таким образом может влиять на состав эксудата при SASP [19, 41, 42].

Хотелось бы привлечь внимание к опубликованному в июле 2017 г. обзору Р.К. Мауга и соавт. [43], в котором обсуждаются возможности использования УВ-1 в качестве биологического маркера и терапевтической мишени при различных онкологических заболеваниях. Однако, на наш взгляд, секреторируемой форме этого белка внимания уделено недостаточно.

Заключение

Анализ имеющихся данных показывает, что белок сУВ-1, который определяют в сыворотке крови пациентов и других внеклеточных жидкостях, с повышенной частотой встречается у больных со злокачественными новообразованиями. Таким образом, обнаружение в сыворотке крови пациентов сУВ-1 может служить поводом для назначения обследования на наличие злокачественного новообразования и (или) воспаления. Это позволяет рассматривать сУВ-1 как секреторный онкомаркер.

сУВ-1 влияет на соседние клетки, увеличивая их пролиферацию и ускоряя клеточное движение, т. е. наблюдается четкий биологический эффект сУВ-1. Эти данные свидетельствуют о том, что сУВ-1 является активным компонентом опухолевой прогрессии. Можно полагать, что сУВ-1 – важная составляющая секреторного фенотипа клеточных популяций (SASP). Следовательно, имеет смысл искать пути воздействия на сУВ-1. Поскольку исследований сУВ-1 в крови пациентов немного, необходимо продолжить эту работу, используя иные антитела и другие группы пациентов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 16-34-01 351 Мол_а).

Financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 16-34-01 351 Мол_а).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wolffe A.P. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bio Essays* 1994;16(4):245–51.
2. Familiari M., Almouzni G., Wolffe A.P. Isolation of a potentially functional Y-box protein (MSY-1) processed pseudogene from mouse: evolutionary relationships within the EF1A/dbpB/YB-1 gene family. *Gene* 1994;141(2):255–9.
3. Bargou R.C., Jürchott K., Wagener C. et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic *MDR1* gene expression. *Nat Med* 1997;3(4):447–50.
4. Kuwano M., Uchiumi T., Hayakawa H. et al. The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci* 2003;94(1):9–14.
5. Ставровская А.А., Генс Г.П. Новое в изучении множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;(1):39–51. [Stavrovskaya A.A., Guens G.P. News in the studies of multidrug resistance of breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2015;(1):39–51. (In Russ.)].
6. Елисеєва И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П. Y-бок-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. *Успехи биологической химии* 2011;(51):65–132. [Eliseeva I.A., Kim E.R., Gur'yanov S.G., Ovchinnikov L.P. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Uspekhi biologicheskoy khimii* = *Advances in Biochemistry* 2011;(51):65–132. (In Russ.)].
7. Lasham A., Print C.G., Woolley A.G. et al. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J* 2013;449(1):11–23.
8. Kretov D.A., Curmi P.A., Hamon L. et al. mRNA and DNA selection via protein multimerization: YB-1 as a case study. *Nucleic Acids Res* 2015;43(19):9457–73.
9. Kim E.R., Selyutina A.A., Buldakov I.A. et al. The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress. *Cell Cycle* 2013;12(24):3791–803.
10. Kljashtorny V., Nikonov S., Ovchinnikov L. et al. The cold shock domain of YB-1 segregates RNA from DNA by non-bonded interactions. *PLoS One* 2015;10(7):e0130318.
11. Lyabin D.N., Eliseeva I.A., Ovchinnikov L.P. YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5(1):95–110.
12. Wang X., Guo X.B., Shen X.C. et al. Prognostic role of YB-1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(2):1780–91.
13. Jiang L., Yuan G.L., Liang Q.L. et al. Positive expression of Y-box binding protein 1 and prognosis in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;10.
14. Shinkai K., Nakano K., Cui L. et al. Nuclear expression of Y-box binding protein-1 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer and its knockdown inhibits tumor growth and metastasis in mice tumor models. *Int J Cancer* 2016;139(2):433–45.
15. Kosnopfel C., Sinnberg T., Schitteck B. Y-box binding protein 1 – a prognostic marker and target in tumour therapy. *Eur J Cell Biol* 2014;93:61–70.
16. Frye B.C., Halfter S., Djurdjaj S. et al. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep* 2009;10(7):783–9.
17. Rauen T., Raffetseder U., Frye B.C. et al. YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem* 2009;284(39):26928–40.
18. van Roeyen C.R., Scurt F.G., Brandt S. et al. Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities. *Cell Commun Signal* 2013;11:63.
19. Raffetseder U., Rauen T., Djurdjaj S. et al. Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1. *Kidney Int* 2009;75(2):185–96.
20. Kang S., Lee T.A., Ra E.A. et al. Differential control of interleukin-6 mRNA levels by cellular distribution of YB-1. *PLoS One* 2014;9(11):e112754.
21. Moiseeva N.I., Stromskaya T.P., Rybalkina E.Y. et al. Effects of extracellular YB-1 protein on cultured cells of human breast cancer. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol* 2013;7:21–8.
22. Shi J., Li P., Zou L. et al. Extracellular Y-box binding protein-1 promotes proliferation and metastasis of HepG2 cells through Notch3 receptor. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2016;24:202–6.
23. Gordillo G.M., Biswas A., Khanna S. et al. Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP-1)-dependent Glutathione Disulfide (GSSG) efflux as a critical survival factor for oxidant-enriched tumorigenic endothelial cells. *J Biol Chem* 2016;291:10089–103.
24. Tacke F., Kanig N., En-Nia A. et al. Y-box protein-1/p18 fragment identifies malignancies in patients with chronic liver disease. *BMC Cancer* 2011;11:185.
25. Tacke F., Galm O., Kanig N. et al. High prevalence of Y-box protein-1/p18 fragment in plasma of patients with malignancies of different origin. *BMC Cancer* 2014;14:33.
26. Rohr I., Braicu E.I., En-Nia A. et al. Y-box protein-1/p18 as novel serum marker for ovarian cancer diagnosis: a study by the Tumor Bank Ovarian Cancer (TOC). *Cytokine* 2016;85:157–64.
27. Ahrens T., Silveira C.G., Banz-Jansen C. et al. Evaluation of YB-1 levels in patients with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2015;191:68–71.
28. Pu L., Jing S., Bianqin G. et al. Development of a Chemiluminescence immunoassay for serum YB-1 and its clinical application as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Hepat Mon* 2013;13:e8918.
29. Ferreira A.R., Bettencourt M., Alho I. et al. Serum YB-1 (Y-box binding protein 1) as a biomarker of bone disease progression in patients with breast cancer and bone metastases. *J Bone Oncol* 2017;6:16–21.
30. Yang W.H., Bloch D.B. Probing the mRNA processing body using protein microarrays and “autoantigenomics”. *RNA* 2007;13(5):704–12.
31. Degen S.C. YB-1: Functional analysis of a potential serum marker for neuroblastoma. *Duisburg-Essen* 2012;1–99.
32. Campisi J., Andersen J.K., Kapahi P., Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* 2011;21(6):354–9.
33. Davalos A.R., Coppe J.P., Campisi J., Desprez P.Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(2):273–83.
34. Byun H.O., Lee Y.K., Kim J.M., Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB Rep* 2015;48:549–58.
35. Malaquin N., Martinez A., Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* 2016;82:39–49.
36. Lu Z.H., Books J.T., Ley T.J. YB-1 Is Important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol* 2005;25(11):4625–37.
37. Rodier F., Coppé J.P., Patil C.K. et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009;11(8):973–9.
38. Kotake Y., Ozawa Y., Harada M. et al. YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. *Genes Cells* 2013;18(11):999–1006.
39. Tauro B.J., Mathias R.A., Greening D.W. et al. Oncogenic H-ras reprograms Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell-de-

- rived exosomal proteins following epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(8): 2148–59.
40. Gopal S.K., Greening D.W., Mathias R.A. et al. YBX1/YB-1 induces partial EMT and tumorigenicity through secretion of angiogenic factors into the extracellular microenvironment. *Oncotarget* 2015;6(15):13718–30.
41. Castellana B., Aasen T., Moreno-Bueno G. et al. Interplay between YB-1 and IL-6 promotes the metastatic phenotype in breast cancer cells. *Oncotarget* 2015;6(35):38239–56.
42. Raffetseder U., Liehn E.A., Weber C., Mertens P.R. Role of cold shock Y-box protein-1 in inflammation, atherosclerosis and organ transplant rejection. *Eur J Cell Biol* 2012;91(6–7):567–75.
43. Maurya P.K., Mishra A., Yadav B.S. et al. Role of Y Box Protein-1 in cancer: as potential biomarker and novel therapeutic target. *J Cancer* 2017;8(10):1900–7.

Фармакогенетическое тестирование аллельных вариантов гена *CYP2D6* при гормоноположительном раке молочной железы

Л.Н. Любченко, М.Г. Филиппова, Т.А. Шендрикова, Л.Г. Жукова,
Н.И. Мехтиева, О.В. Крохина, С.М. Портной

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

Тамоксифен является препаратом выбора при эндокринотерапии гормоноположительного рака молочной железы у женщин в репродуктивном возрасте. Метаболическая активность тамоксифена в организме определяется активностью фермента CYP2D6, кодируемого одноименным геном: под действием фермента тамоксифен переходит в метаболически активную форму — эндоксифен. Фармакогенетическое тестирование гена CYP2D6 у пациентов с гормоноположительным раком молочной железы поможет прогнозировать эффективность терапии и оценить риск развития побочных эффектов в целях улучшения отдаленных результатов лечения.

Ключевые слова: тамоксифен, фармакогенетическое тестирование, ген *CYP2D6*, гормонотерапия, рак молочной железы

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-57-66

Pharmacogenetic testing of allelic variants of the *CYP2D6* gene in hormone positive breast cancer

L.N. Lyubchenko, M.G. Filippova, T.A. Shendrikova, L.G. Zhukova, N.I. Mekhtieva, O.V. Krokhina, S.M. Portnoy

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

Tamoxifen is the drug of choice for endocrine therapy of hormone receptor- positive breast cancer in women in the reproductive period. The metabolic activity of tamoxifen is determined by the activity of the enzyme CYP2D6, encoded by the gene of the same name: under the action of the enzyme, tamoxifen passes into the metabolically active form, endoxyphene. Pharmacogenetic testing of the CYP2D6 gene in patients with hormone-positive breast cancer can help predict the effectiveness of therapy and assess the risk of side effects with the aim of improving long-term treatment outcomes.

Key words: tamoxifen, pharmacogenetics testing, *CYP2D6* gene, hormone therapy, breast cancer

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место среди злокачественных заболеваний у женщин в России — 20,9 % случаев за 2015 г. В структуре смертности в 2012 г. РМЖ также занимал 1-е место [1].

РМЖ представляет собой фенотипически и генотипически сложное онкологическое заболевание, при котором клиническая симптоматика, результаты лечения и прогноз зависят от подтипа и подгруппы опухоли, определяемых на основании комплексных методик с привлечением инструментальных техник, традиционных морфологических маркеров, постоянно развивающихся методов иммуногистохимии и молекулярной генетики. Виды терапии также прошли длительный путь от сложных схем комбинированного и комплексного лечения до монотерапии целевого назначения. Эндокринотерапия занимает важное место в лечении рецептор-положительного РМЖ, позволяя получить

хорошие результаты при низкой токсичности лечения. Тамоксифен широко используется в химиотерапии и профилактике рецидивов эстрогензависимых (ER+) форм РМЖ. Продолжительные исследования показали, что его применение снижает риск рецидива и смерти на 30 % (независимо от использования систематической химиотерапии), по другим данным, — на 50 %. Ингибиторы ароматазы (анастрозол и летрозол) результативнее тамоксифена, но из-за значительного количества побочных эффектов подходят гораздо меньшему числу пациентов. Метаболическая активность тамоксифена в организме определяется активностью фермента *CYP2D6*, кодируемого одноименным геном: под действием фермента тамоксифен переходит в метаболически активную форму — эндоксифен.

Было обнаружено, что различные аллельные варианты гена *CYP2D6* по-разному влияют на активность фермента и в конечном счете на метаболическую

активность тамоксифена. Так, для пациентов с 2 неактивными (нефункциональными) аллелями *CYP2D6* характерен низкий уровень метаболизма тамоксифена (poor metabolizer group), для пациентов с 1 или 2 малоактивными аллелями или с 1 неактивным/малоактивным и 1 активным аллелями – сниженный уровень метаболизма (intermediate metabolizer group), для пациентов с 2 активными аллелями – нормальный уровень метаболизма (ultrarapid metabolizer group). Для первых 2 групп пациентов терапевтический эффект от применения тамоксифена снижен или даже отсутствует.

Ген *CYP2D6* крайне полиморфичен – для него описано более 100 аллелей. Ниже представлены основные типы аллелей, ассоциированные с активностью фермента, влияющего на метаболизм тамоксифена, наиболее клинически значимые из них: *3, *4, *5, *6, *9, *10, *17, *41.

Активные аллели	*1, *2, *33, *35
Малоактивные аллели	*9, *10, *17, *29, *36, *41
Неактивные аллели	*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11–*16, *19–*21, *38, *40, *42

В ряде ретроспективных исследований было показано, что пациенты с генотипом *CYP2D6**4/*4 имели значимо более короткий безрецидивный период, чем пациенты с генотипами, содержащими активный аллель wild type (wt) – *4/wt и wt/wt, однако по показателям общей выживаемости достоверных различий не обнаружено. Кроме того, у пациентов с гомозиготным генотипом *4/*4, как и у пациентов, принимавших в течение 2–3 лет ингибиторы *CYP2D6* (например, селективный ингибитор обратного захвата серотонина (ИОЗС)), риск развития рецидива был значительно выше. Скрининг аллельных вариантов *CYP2D6* рекомендован Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG, Нидерланды) в качестве обязательного перед назначением адъювантной гормональной терапии. В соответствии с рекомендациями DPWG пациентам со сниженным уровнем метаболизма следует избегать приема ингибиторов *CYP2D6*, а при наступлении постменопаузы – рассматривать применение ингибиторов ароматазы вместо тамоксифена; для пациентов из группы с низким уровнем метаболизма – учитывать повышенный риск развития рецидива заболевания и при наступлении постменопаузы рассматривать применение ингибиторов ароматазы.

Важно отметить, что аллелям гена *CYP2D6* свойственна различная частота встречаемости в популяции в зависимости от ее этнических характеристик. По некоторым данным, 6–10 % лиц европеоидной расы имеют генотип с 2 неактивными аллелями, как правило *4 и *5, менее 40 % – генотип с 2 активными аллелями, более 50 % – смешанные генотипы с активным и неактивным или малоактивным аллелями. Вклад этнической вариативности в общую генетическую детерминированность метаболизма тамоксифена изучен

недостаточно, поскольку большинство исследований было проведено на этнически однородных группах [2].

Роль цитохрома P450 2D6 в метаболизме тамоксифена

Цитохром P450 (*CYP-450*) – суперсемейство гемопротеинов, катализирующих реакции монооксигеназ у всех живых существ. У эукариотических организмов эти протеины являются мембранными и участвуют в метаболизме эндогенных соединений, токсинов и экзогенных веществ (лекарственных средств (ЛС)). Ферменты метаболизма суперсемейства *CYP-450* участвуют в I фазе метаболизма ЛС. В начале 60-х годов прошлого века *CYP-450* считался одним из ферментов, вовлеченных в метаболизм ксенобиотиков и стероидов. В 1970-х годах было выделено 6 энзимов *CYP-450*, затем группа ученых под руководством F.J. Gonzales выделила первый изолят комплементарной ДНК, кодирующий белок *CYP-450* [3, 4]. Белки *CYP-450* распределены в семейства и подсемейства в зависимости от идентичности аминокислотной последовательности. Ферменты, идентичные на 40 %, объединены в семейства и обозначаются арабскими цифрами, а ферменты, идентичные на 55 %, составляют подсемейства и обозначаются буквой латинского алфавита [4, 5]. По данным К.А. Phillips и соавт. из Университета Калифорнии, 56 % ЛС с нежелательными побочными реакциями метаболизируются полиморфными ферментами I фазы метаболизма, среди которых 86 % составляют ферменты *CYP-450* [6]. Такие межиндивидуальные отличия в ответе на лекарственное лечение, как нежелательные лекарственные реакции (НЛР) и отсутствие терапевтического эффекта связаны с генетическими особенностями метаболизма ЛС и являются серьезной проблемой в клинической практике. По данным проведенного в США метаанализа, частота выраженных побочных эффектов составляет 6,7 %, а число смертей от НЛР в год достигает 100 тыс. [7–9], что определяет необходимость проведения фармакогенетического тестирования в целях индивидуального подбора терапии.

Доля гормоноположительного РМЖ составляет 65–75 % всех случаев инвазивного РМЖ [10]. С начала 1980-х годов тамоксифен – селективный модулятор эстрогеновых рецепторов – является «золотым стандартом» в лечении эстрогенположительного РМЖ. На сегодняшний день стандартом длительности гормонотерапии определен срок в 5 лет с возможностью дальнейшего продления лечения еще на 5 лет. В исследовании ATLAS (Adjuvant Tamoxifen-Longer Against Shorter), которое особенно актуально для женщин репродуктивного возраста, оценивали преимущества приема тамоксифена в течение 10 лет по сравнению с 5-летним приемом. Во 2-й «пятилетке» не получено достоверных различий в общей и безрецидивной выживаемости в сравниваемых группах. Однако в последующие после окончания приема 5 лет риск случаев летального исхода от РМЖ был ниже на 2,8 %

в группе приема тамоксифена длительностью 10 лет, чем в группе приема в течение 5 лет [11]. Преимущество 10-летнего использования тамоксифена также было продемонстрировано в исследовании aTTom (adjuvant Tamoxifen – to offer more?) [12]. Однако у некоторых больных, несмотря на иммуногистохимически подтвержденный гормоноположительный статус опухоли, применение тамоксифена оказалось неэффективно.

Метаболизм тамоксифена осуществляется преимущественно в печени, где он подвергается 4-гидроксилированию, в результате чего образуется активный метаболит тамоксифена – эндоксифен. По разным данным, у больных гормоноположительным РМЖ при приеме тамоксифена в стандартной дозе 20 мг/сут концентрация 4-гидроксиатамоксифена составляет 10–20 % от концентрации эндоксифена, который примерно в 100 раз легче связывается с рецепторами эстрогенов, чем его предшественники [13–16].

Фармакологическая активность тамоксифена зависит от его преобразования ферментами CYP-450 (CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C19) [17, 18]. По данным исследования *in vitro*, CYP2D6 метаболизирует более 75 ксенобиотиков, что составляет приблизительно 25 % наиболее часто назначаемых ЛС, многие из которых имеют узкое терапевтическое применение [19–21]. Так, результаты исследований, изучавших метаболизм тамоксифена с использованием микросом печени человека, показали, что тамоксифен катализируется ферментом CYP3A4, а эндоксифен – CYP2D6 [22, 23]. Каталитическая активность CYP2D6 влияет на концентрацию эндоксифена, определяя терапевтическую эффективность [24]. В отличие от CYP2D6, полиморфизм генов CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5 не влияет на фармакокинетику и фармакодинамику тамоксифена. [16, 17, 23, 25].

CYP2D6 – одна из главных изоформ CYP-450, играющая ключевую роль в метаболизме различных ЛС (тамоксифен, антидепрессанты, антипсихотики, антиаритмики, опиоиды и др.) [26–28]. Нормальную метаболическую активность энзима кодируют некоторые из аллельных вариантов: CYP2D6*1, *2, *33, *35, тогда как низкую активность определяют аллели CYP2D6*9, *10, *17, *29, *36, *41, *69, неактивными являются аллели CYP2D6*3, *4, *6, *7, *8, *11–*15, *18–*21, *31, *38, *40, *42, *44, высокую активность демонстрируют аллели *2NX, *35X2. CYP2D6*4 – самый распространенный неактивный аллель у представителей европейской популяции, частота встречаемости которого составляет 20–25 %. Для азиатской популяции распространенным аллельным вариантом является CYP2D6*10 [28–30]. Согласно данным, полученным при изучении российской популяции, частота распространения CYP2D6*4 в гомо- и гетерозиготном состоянии сопоставима с таковой в европейской популяции и составляет 30 %. [31].

В зависимости от того, к каким последствиям для скорости биотрансформации ЛС приводит носи-

тельство (гетерозиготное/гомозиготное) или носительство (wt) однонуклеотидного полиморфизма гена CYP2D6, пациенты подразделяются на группы.

- Распространенные метаболизеры (extensive metabolizers, EMs) – пациенты с нормальной скоростью биотрансформации тамоксифена, не несущие однонуклеотидных полиморфизмов по гену CYP2D6. Для этих пациентов применяют стандартные режимы дозирования средних доз тамоксифена.
- Медленные метаболизеры – пациенты со сниженной скоростью биотрансформации тамоксифена, которые являются гомозиготами (poor metabolizers, PMs) или гетерозиготами (intermedium metabolizers, IMs) по однонуклеотидным полиморфизмам гена CYP2D6 (2549delA, 1846G>A, 1707delT, 2935A>C, 1758G>T). У таких пациентов происходит синтез дефектного фермента со сниженной активностью.
- Сверхактивные, или быстрые метаболизеры (ultraextensive metabolizers, UMs), – носители дупликаций или мультипликаций функционально нормальных аллелей CYP2D6*1, CYP2D6*2. У этой категории пациентов регистрируют низкую, недостаточную для достижения терапевтического эффекта концентрацию ЛС. Для UMs доза ЛС-субстрата CYP2D6 должна быть выше, чем для EMs.

Однако в отношении тамоксифена, который является пролекарством, у UMs образуется больше активного метаболита эндоксифена. Таким пациентам требуется снижение дозы пролекарства или полное прекращение его использования во избежание побочных эффектов. Например, применение у пациентов с дупликацией гена CYP2D6 анальгетика трамадола, который также является пролекарством, приводит к увеличению концентрации активного метаболита в крови и более высокой частоте и выраженности побочных реакций – тошноте, дыхательным нарушениям и др. [28, 32–34]. Было показано, что у IMs и PMs концентрация эндоксифена была ниже на 60 и 74 %, чем у EMs. Ген-дозазависимый эффект также продемонстрирован для тамоксифена и соотношения метаболитов N-дисметилтамоксифен/эндоксифен [35–37].

Результаты изучения генетической гетерогенности CYP2D6 в опухолевой ткани рака молочной железы

В исследованиях, выполненных в Германии и США, проведен ретроспективный анализ данных 1325 больных РМЖ I–III стадий, из которых у 95,4 % пациенток на момент постановки диагноза уже наступила менопауза. Критериями включения являлись положительный статус по рецепторам эстрогенов, отсутствие метастазов на момент включения в исследование, прием тамоксифена адъювантно и отсутствие химиотерапии. ДНК выделяли из лимфоцитов

периферической крови больных и из опухолевой ткани. Аллельные варианты гена *CYP2D6* *10, *41 коррелировали со сниженной активностью фермента, а аллели *3, *4, *5 были отнесены к неактивным. Медиана наблюдения составила 6,3 года. В течение 9 лет частота возникновения рецидивов составила 14,9, 20,9 и 29,0 % у EMs, IMs и PMs соответственно. В группах IMs и PMs был значительно повышен риск развития рецидива по сравнению с EMs (время до развития рецидива, относительный риск (ОР) 1,40 и 1,90 соответственно). Различия показателей общей выживаемости между этими группами были статистически недостоверны, тогда как безрецидивная выживаемость и выживаемость без признаков заболевания у IMs и PMs по сравнению с EMs была меньше [38]. На основании полученных данных авторы сделали вывод о том, что пациенты группы PMs не должны получать тамоксифен.

Результаты ряда других работ не показали подобной взаимосвязи. Так, в масштабном исследовании BIG 1–98 (Breast International Group) (табл. 1) оценивалась эффективность адъювантной гормонотерапии тамоксифеном у женщин в зависимости от носительства полиморфизмов гена *CYP2D6*. В исследование были включены 4393 женщины в периоде постменопаузы с гормоноположительным РМЖ, которые рандомизированы двойным слепым методом и получали в качестве лечения тамоксифен и/или летрозол. Для исследования была выделена ДНК из опухолевой ткани. Медиана наблюдения составила 5 лет. У PMs и IMs был статистически незначимо снижен риск развития рецидива РМЖ по сравнению с EMs. Результаты исследования не подтвердили наличия ассоциации генотипа *CYP2D6* с безрецидивным периодом у пациентов, получавших тамоксифен в монотерапии без предшествующей химиотерапии [39].

Похожим по дизайну и задачам явилось клиническое исследование АТАС (Arimidex, Tamoxifen, Alone or Combination) (см. табл. 1), в котором пациентки ($n = 1203$) с гормоноположительным РМЖ I, II и IIIA стадий были рандомизированы в группы принимавших тамоксифен ($n = 588$) и анастрозол ($n = 615$). Генотипирование *CYP2D6* выполнено на ДНК, выделенной из опухолевой ткани под контролем патоморфолога. Медиана наблюдения составила 10 лет. По результатам исследования статистически значимой корреляции генотипа *CYP2D6* с развитием рецидива РМЖ при лечении тамоксифеном и анастрозолом не обнаружено [40].

Результаты вышеописанных широкомасштабных исследований привели к выводу о нецелесообразности выполнения генетического тестирования в клинической практике. Однако позже исследователи BIG 1–98 опубликовали сообщение о возможной методологической ошибке в отношении сбора материала — использования ДНК, полученной не из нативной, а из опухолевой ткани, что могло привести к получению

недостоверных результатов по причине потери гетерозиготности в опухолевой ткани [41].

Группа ученых из Нидерландов в рамках международного исследования TEAM (Tamoxifen Exemestan Adjuvant Multinational) (см. табл. 1), включившем в общей сложности 9779 пациенток в периоде постменопаузы с гормоноположительным ранним РМЖ, показала различия в частоте аллелей *CYP2D6* при тестировании ДНК, выделенной из опухолевой ткани, полученной из срезов парафиновых блоков ($n = 746$), и герминальной ДНК, полученной из нативной ткани и/или периферической крови. Результаты данного исследования также не подтвердили статистической разницы между носительством аллелей гена *CYP2D6*, ассоциированных с медленным метаболизмом, и уменьшением времени до развития рецидива заболевания. Однако авторы не исключают погрешности в результатах генотипирования *CYP2D6* в опухолевой ткани [42].

В проспективном исследовании ABCSG 8 (Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8) (см. табл. 1), изучавшим корреляции генотипа *CYP2D6* с эффективностью тамоксифена, продемонстрировано, что у женщин, относящихся к группе PMs (*CYP2D6**3, *4, *6) и получавших на протяжении 5 лет тамоксифен в качестве препарата адъювантной гормонотерапии в дозе 20 мг/сут, вероятность развития рецидива или смерти была статистически выше по сравнению с группой EMs (все аллели, не относящиеся к PMs и IMs; ОР 2,45). К группе IMs отнесли аллели *CYP2D6**10, *41. Также показано, что пациенты с 1 нефункциональной аллельной парой гена *CYP2D6* имеют более высокие риски возникновения рецидива по сравнению с пациентами без аллелей PMs. Однако этот эффект не наблюдался у больных, переведенных на анастрозол после 2-летнего приема тамоксифена. Эти данные позволяют предположить, что влияние генотипа *CYP2D6* может быть замаскировано, если пациенты получают тамоксифен непродолжительное время или другие препараты помимо тамоксифена, тем самым изменяя риск развития рецидива [43].

В работе J. Karle и соавт. (см. табл. 1) анализировали данные пациентов с распространенным гормоноположительным РМЖ, получавших тамоксифен ранее или постоянно в паллиативных целях. Критерием исключения из исследования явилась сопутствующая терапия ингибиторами *CYP2D6*. Ретроспективно проанализированы такие данные, как эффективность лечения тамоксифеном, безрецидивная и общая выживаемость, лечение, предшествовавшее терапии тамоксифеном, количество и локализация метастазов, сопутствующая терапия. Период наблюдения длился от момента начала приема тамоксифена при возникновении метастазов до наступления смерти или до окончания исследования. Для выделения ДНК использовали периферическую кровь ($n = 51$) и клетки опухоли, фиксированные в парафиновых блоках

Таблица 1. Результаты международных исследований по изучению эффективности тамоксифена в зависимости от генотипа CYP2D6

Исследование	Лечение	Выделение ДНК	Распределение больных	Медиана наблюдения, лет	Риск развития рецидива	БРВ	Выживаемость без признаков заболевания	Общая выживаемость
W. Schroth и соавт., 2009 [38]	Тамоксифен без химиотерапии	Опухолевые блоки	EMs	6,3	Повышен для IMs и PMs по сравнению с EMs	Меньше у IMs и PMs по сравнению с EMs (ОР 1,33; 95 % ДИ 1,06–1,68)	Меньше у IMs и PMs по сравнению с EMs (ОР 1,29; 95 % ДИ 1,03–1,61)	Различия незначительны (ОР 1,15; 95 % ДИ 0,88–1,15)
			IMs – *10, *41		ОР 1,40; 95 % ДИ 1,04–1,90			
			PMs – *3, *4, *5		ОР 1,90; 95 % ДИ 1,10–3,28			
BIG (Breast International Group) 1–98 [39]	Тамоксифен/летрозол	Опухолевые блоки	EMs – все аллели, кроме IMs, PMs	5,0	Снижен для PMs и IMs по сравнению с EMs (ОР 0,86; 95 % ДИ 0,60–1,24)	–	Различия между группами статистически недостоверны	–
			IMs – *41					
			PMs – *3, *4, *6, *7					
ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or Combination) [40]	Тамоксифен/анастрозол	Опухолевые блоки	–	10,0	PMs при сравнении с EMs: ОР 0,99; 95 % ДИ 0,48–2,08; $p = 0,099$	PMs при сравнении с EMs: ОР 1,25; 95 % ДИ 0,55–3,15; $p = 0,064$	Различия между группами не оценены	–
TEAM (Tamoxifen Exemestan Adjuvant Multinational) [42]	Тамоксифен	Опухолевые блоки/нативная ткань в блоках	–	2,5	–	CYP2D6*4, *41 и фенотип (PMs при сравнении с EMs: ОР 1,33; 95 % ДИ 0,52–3,43; $p = 0,55$) не связаны с БРВ	–	–
ABCSG 8 (Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8) [43]	Тамоксифен/тамоксифен + анастрозол	Опухолевые блоки	EMs – все аллели, кроме IMs и PMs	5,0	Повышен для PMs по сравнению с EMs (ОР 2,45; 95 % ДИ 1,05–5,73; $p = 0,04$)	–	–	–
			IMs – *10, *41					
			PMs – *3, *4, *6					
J. Karle и соавт., 2013 [44]	–	Опухолевые блоки/кровь	–	5,0	–	Меньше у IMs/IMs, IMs/PMs, PMs/PMs по сравнению с EMs/EMs, EMs/IMs, EMs/PMs (ОР 2,19; 95 % ДИ 1,15–4,18; $p = 0,017$)	–	Меньше у IMs/IMs, IMs/PMs, PMs/PMs по сравнению с EMs/EMs, EMs/IMs, EMs/PMs (ОР 2,79; 95 % ДИ 1,12–6,99; $p = 0,028$)

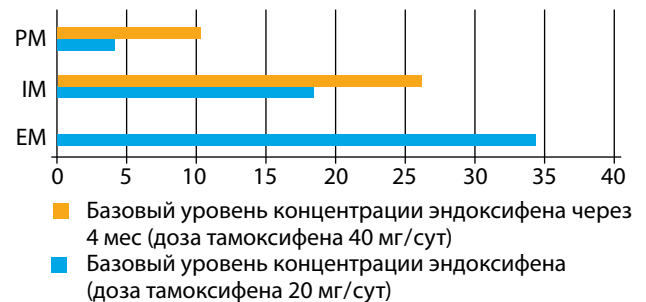
Примечание. EMs – extensive metabolizers, распространенные метаболиты; IMs – intermediate metabolizers, медленные метаболиты, гетерозиготы; PMs – poor metabolizers, медленные метаболиты, гомозиготы; ОР – относительный риск; ДИ – доверительный интервал; p – критерий достоверности; БРВ – безрецидивная выживаемость.

($n = 43$). По результатам исследования безрецидивная выживаемость была ниже в группе с нефункциональными аллелями — медиана составила 9 мес для пациентов групп IMs и PMs и 14 мес для группы EMs. Общая выживаемость была существенно ниже для группы пациентов с неактивными аллелями (IMs, PMs) по сравнению с группой EMs. Общая 5-летняя выживаемость составила 76,3 % в группе EMs и 45,8 % в группах IMs и PMs [44].

В метаанализе, изучавшем влияние полиморфизма гена *CYP2D6* на исходы РМЖ, проведенном китайскими учеными, подтверждена взаимосвязь между безрецидивной выживаемостью пациентов, получавших терапию тамоксифеном, и генотипом *CYP2D6*. В анализ были включены данные 11 701 пациентки из 20 различных исследований. Безрецидивная и общая выживаемость была лучше в группе IMs по сравнению с PMs ($p = 0,002$ и $0,021$ соответственно). При разделении пациенток на подгруппы безрецидивная выживаемость оказалась значительно меньше в группе IMs по сравнению с EMs ($p = 0,035$), в азиатской популяции ($p = 0,001$), при продолжительности терапии тамоксифеном 5 лет ($p = 0,006$), в группе с сопутствующей химиотерапией ($p = 0,025$), а также в группе монотерапии тамоксифеном ($p = 0,045$) [45].

Результаты изучения генетической гетерогенности *CYP2D6* в плазме крови больных раком молочной железы

Проспективные фармакологические исследования последовательно демонстрируют разницу в концентрации эноксифена в плазме крови в зависимости от носительства аллельных вариантов гена *CYP2D6*. Действие тамоксифена реализуется в зависимости от длительности приема и дозы [11, 12, 15]. Одним из таких исследований явилась работа W.J. Jr Ivin и соавт., в которой изучалось влияние активности метаболита тамоксифена эноксифена в зависимости от выбранного режима дозирования. В исследовании участвовали 119 больных РМЖ, получавших тамоксифен в течение >4 мес без сопутствующей терапии ингибиторами *CYP2D6*. В зависимости от носительства аллельных вариантов гена *CYP2D6* пациенты были подразделены на группы: EMs (*CYP2D6**1, *2, *35), IMs (*CYP2D6**9, *10, *17, *29, *41) и PMs (*CYP2D6**3, *4, *5, *6). Базовый уровень эноксифена в плазме крови у пациенток группы EMs в среднем составил 34,3 нг/мл, что оказалось значительно выше, чем у пациенток групп IMs и PMs — 18,5 ($p = 0,00045$) и 4,2 нг/мл ($p = 0,001$) соответственно. На основании полученных данных пациентки групп IMs и PMs были переведены с дозы приема тамоксифена 20 на 40 мг/сут, в результате чего концентрация эноксифена в плазме крови возросла на 7,6 нг/мл в группе IMs (от 0,6 до 23,9 нг/мл базовой концентрации; $p = 0,0001$) и на 6,1 нг/мл в группе PMs (от 2,6 до 12,5 нг/мл базовой концентрации; $p = 0,020$) (см. рисунок) [30, 46].



Изменение концентрации эноксифена у пациенток групп IMs и PMs при смене режима дозирования тамоксифена. PMs — poor metabolizers, медленные метаболитеры, гомозиготы; IMs — intermediate metabolizers, медленные метаболитеры, гетерозиготы; EMs — extensive metabolizers, распространенные метаболитеры (адаптировано из [46])

Японские ученые проанализировали изменение концентрации метаболитов тамоксифена в зависимости от генотипа и изменения дозы препарата. В исследовании приняли участие 98 больных, получавших тамоксифен в стандартной дозе 20 мг/сут. Пациентки были разделены на 3 группы: EMs, IMs, PMs, у которых суточная доза тамоксифена соответственно составила 20, 30 и 40 мг. Длительность исследования — 8 нед. Доза препарата была увеличена у 51 пациента — носителя нефункциональных аллелей. У пациенток с генотипом *CYP2D6**10/*10 при повышении дозы тамоксифена с 20 до 40 мг/сут концентрация эноксифена увеличилась в 1,69 раза — с 9,3 до 15,8 нг/мл ($p = 0,001$). У пациенток с генотипом *CYP2D6**1/*10 доза тамоксифена была увеличена до 30 мг/сут, что повысило концентрацию эноксифена в плазме крови в 1,41 раза (22,4 нг/мл; $p = 0,001$). У пациенток с *CYP2D6**1/*1 при дозе тамоксифена 20 мг/сут концентрация эноксифена в плазме составила 19,7 нг/мл ($p = 0,076$). Больные с гетерозиготным генотипом *CYP2D6**10 и нулевым аллелем, включая *5, *21, *36 — *36, показали схожие результаты с пациентами — носителями генотипа *CYP2D6**10/*10: увеличение в 1,94 раза концентрации эноксифена в плазме крови. При оценке развития побочных эффектов не выявлено существенных различий между пациентами с генотипом *CYP2D6**1/*1, получавших дозу тамоксифена 20 мг/сут, и теми, у кого доза была увеличена до 30 и 40 мг/сут ($p = 0,32$) [47].

В работу L. Madlensky и соавт. были включены женщины ($n = 1370$) из исследования WHEL (Women's Healthy Eating and Living) с положительным статусом РМЖ по рецепторам эстрогенов. Оценивали корреляцию концентрации эноксифена в сыворотке крови с генотипом *CYP2D6*. Исследовали возможность ассоциации развития рецидива РМЖ с уровнем концентрации тамоксифена, 4-гидрокситамоксифена, N-дистамоксифена. По результатам исследования не обнаружено различий в уровне тамоксифена в плазме крови в зависимости от генотипа *CYP2D6*. Однако для концентрации эноксифена, 4-гидрокситамоксифена и N-дистамоксифена отмечена устойчивая взаимосвязь с исследуемым генотипом *CYP2D6*

($p = 0,35$). Концентрация эндоксифена в плазме крови $>5,97$ нг/мл снижала на 30 % риск возникновения новых случаев РМЖ [37].

Единственное исследование было посвящено изучению частоты развития НЛР, связанных со сверхбыстрым метаболизмом (UMs) у пациентов с ранним РМЖ, получавших монотерапию тамоксифеном. По результатам исследования зафиксированы 2 и более нежелательные реакции на тамоксифен по сравнению с пациентами групп EMs, IMs и PMs ($p = 0,030$) [48].

Данные проведенных исследований позволяют предположить возможные преимущества от увеличения дозы у IMs и PMs, однако необходимо учитывать частоту развития НЛР при более высоких дозах. Для получения достоверных результатов анализа НЛР важным является оценка соматической патологии и сопутствующей лекарственной терапии перед включением в исследование в целях устранения некорректной оценки и искажения фактических результатов [49, 50].

При применении тамоксифена одними из побочных эффектов могут быть приливы, вазомоторные нарушения и депрессия [51]. Использование ИОЗС способствует ослаблению этих симптомов. Существует мнение о том, что совместное применение тамоксифена и ИОЗС снижает эффективность первого. Это связано с тем, что оба препарата метаболизируются в печени в свою активную форму цитохрома *CYP2D6*, в результате чего происходит ингибирование *CYP2D6* антидепрессантом и, как следствие, отсутствие противоопухолевого эффекта тамоксифена. На основании этого был проведен ряд клинических исследований, оценивающих эффект от совместного применения ИОЗС и тамоксифена. По результатам таких исследований ЛС были разделены на препараты с сильным и слабым эффектом в отношении подавления активности *CYP2D6* (табл. 2) [52].

В исследовании нидерландских ученых проанализирована замена антидепрессантов с потенциально сильной активностью в отношении ингибирования *CYP2D6* (пароксетин, флуоксетин) на антидепрессанты со слабой подавляющей активностью энзима *CYP2D6* (эсциталопрам, венфлаксин) и влияние этой замены на уровень концентрации метаболитов тамоксифена в плазме крови. Фармакологический мониторинг проводился в течение 24 ч. В результате замены концентрация эндоксифена в плазме крови увеличилась примерно в 3 раза ($p = 0,012$). Отношение эндоксифена к N-дисметилтамоксифену и 4-гидрокситамоксифена к тамоксифену увеличилось в 3,3 и 1,5 раза соответственно с повышением активности энзимов *CYP2D6*. Смена антидепрессантов не повлияла на развитие побочных эффектов или усиление психологических проблем [53]. Схожие результаты были получены и в других исследованиях [52, 54–56]. Вместе с тем в 2 исследованиях, проведенных в США, сообщается об отсутствии ассоциации рецидива со смертностью от РМЖ даже при приеме сильных ингибиторов

CYP2D6. Однако ни в одной из этих работ не рассмотрено конкурентное использование слабых ингибиторов *CYP2D6* и исходов РМЖ [57, 58].

В другом исследовании приняли участие 493 пациента, прошедших химиотерапию и продолживших лечение тамоксифеном в течение >6 мес. Генотипирование проводили по аллелю *CYP2D6*4*. Проанализированы время до прогрессирования, местный рецидив, регионарное и отдаленное метастазирование, частота контралатерального РМЖ и выживаемость без прогрессирования. По результатам исследования не обнаружено существенной разницы во времени до прогрессирования и безрецидивной выживаемости между генотипом *CYP2D6*4* в общей когорте пациентов. В подгруппе пациентов PMs по *CYP2D6*4*, получивших химиотерапию, отмечалось меньшее время до прогрессирования. В этой группе среднее время до прогрессирования и безрецидивная выживаемость у носителей *CYP2D6*4/*4* составили 1 год, у носителей *CYP2D6*1/*4* – 6,30 года и у носителей *CYP2D6*1/*1* – 4,93 года ($p = 0,104$) [59].

M.J. Vijl и соавт., изучавшие полиморфизм *CYP2D6*4* и его влияние на лечение тамоксифеном, показали, что у носителей неактивных аллелей фермента *CYP2D6* повышен риск смерти от РМЖ. В исследование были включены пациенты в возрасте 55 лет и старше. Образцы ДНК получены из плазмы крови. Период наблюдения составил 14 лет (1991–2005). Пациенты были классифицированы в зависимости от генотипа как гомозиготы **4/*4* (PMs), **1/*1* (EMs) и гетерозиготы **1/*4* (IMs). Ассоциация *CYP2D6* со смертностью от РМЖ изучалась в зависимости от генотипа (**1/*1*, **1/*4*, **4/*4*) и его зиготности (**1/*4* и **4/*4* по сравнению с **1/*1*; **4/*4* по сравнению с **1/*4* и **1/*1*). При анализе генотипов риск смерти от РМЖ увеличивался с каждым дополнительным нефункциональным аллелем ($p = 0,015$). Риск смерти при носительстве **4/*4* был выше ($p = 0,041$) по сравнению с вариантом **1/*1*, но не был увеличен в группе гетерозигот **1/*4* ($p = 0,075$). При анализе гомозигот и гетерозигот по аллелю **4* риск смерти от РМЖ составил 2,1 ($p = 0,031$). Также в этом исследовании проанализировано совместное применение препаратов, конкурентно ингибирующих *CYP2D6*, при котором снижение эффективности тамоксифена не подтверждено [60].

Схожие данные демонстрирует другое исследование, в котором сравнивалась безрецидивная и общая выживаемость больных, получавших тамоксифен в качестве гормонотерапии при РМЖ ($n = 206$) и пациентов, не принимавших тамоксифен ($n = 280$). ДНК выделяли из нормальной ткани молочной железы. В зависимости от типа метаболизма пациентов разделили на 3 группы: EMs, PMs и IMs. Анализировали носительство аллельных вариантов гена *CYP2D6*4*, **5*, **10* и **41*. По результатам исследования *CYP2D6* нулевые аллели **4*, **5* были ассоциированы с более высоким

Таблица 2. Лекарственные средства, конкурентно ингибирующие CYP2D6

Класс лекарственных средств	Сильные ингибиторы CYP2D6	Умеренные ингибиторы CYP2D6
Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина	Пароксетин Флуоксетин Бупропион Дулоксетин	Сертралин Циталопрам Флувоксамин Десвенлафаксин Эсциталопрам
Трициклические антидепрессанты	—	Кломипрамин Доксепин Дезипрамин Имипрамин Амитриптилин Нортиптилин
Антипсихотики	Тиоризадин Перфеназин Пимозид	Хлорпромазин Флуфеназин Галоперидол
Препараты для лечения сердечно-сосудистой патологии	Кинидин Тиклопидин	Амиодарон Никардипин Верапамил Амлодипин Фелодипин Нифедипин Лабеталол
Препараты для лечения инфекционных заболеваний	Терфенадин	Ритонавир Галофантрин Хлорохин
H2-антигистаминные средства	—	Циметидин
H1-антигистаминные средства	—	Цлемастин Трипеленнамин Прометазин Гидроксизин Дифенилпиралин
Противогрибковые препараты	Тербинафин	—
Антипаратиреодные средства	—	Цинакалцет
Селективные агонисты бета-3-адренорецепторов	—	Мирабегрон
Нестероидные противовоспалительные средства	—	Целекоксиб
Препараты бензодиазепинового ряда	—	Клобазон

риском развития рецидива ($p = 0,03$). Он был в 2 раза выше у PMs (*4, *5) и PMs/IMs (0/*10, 0/*41) ($p = 0,02$) [61].

Несмотря на различный дизайн исследований, подтверждающих взаимосвязь генотипа CYP2D6 с эффективностью тамоксифена, в некоторых из них не установлена прогностическая значимость изучения аллельных вариантов CYP2D6*4 [62–64].

В настоящее время нет критериев исключения женщин в репродуктивном и пременопаузальном периодах из группы пациентов, для которых стандартная адъювантная гормонотерапия тамоксифеном может быть неэффективной ввиду медленного метаболизма на фоне сопутствующей терапии ингибиторами CYP2D6 (см. табл. 2). На основании данных приведенных исследований определение активности аллельных вариантов гена CYP2D6 поможет в принятии решения о назначении тамоксифена и подборе индивидуальной дозы препарата.

Влияние взаимодействия лекарственных средств на активность фермента CYP2D6

Фармакогенетическая рабочая группа Королевской голландской ассоциации фармацевтов оценила терапевтические рекомендации выбора дозы тамоксифена на основании генотипа CYP2D6. Для генотипов PMs и IMs рекомендовано рассмотреть возможность назначения ингибиторов ароматазы для женщин в периоде постменопаузы в связи с повышенным риском развития рецидива РМЖ при приеме тамоксифена, для IMs рекомендовано избегать одновременного назначения тамоксифена и ингибиторов CYP2D6 (см. табл. 2) [65].

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drugs Administration, FDA) в 2006 г. рекомендовало внести изменения в инструкцию по применению

тамоксифена в целях отражения риска развития рецидива РМЖ у РМЖ по *CYP2D6* [66].

Заключение

Таким образом, результаты многочисленных проведенных исследований по поиску взаимосвязи между носительством аллельных вариантов гена *CYP2D6* и реализацией противоопухолевого эффекта тамоксифена продемонстрировали корреляцию медленно-

го метаболизма с прогрессированием РМЖ на фоне гормонотерапии тамоксифеном. Фармакогенетическое тестирование гена *CYP2D6* у больных гормоноположительным РМЖ поможет спрогнозировать эффективность терапии и оценить риск развития побочных эффектов в целях улучшения отдаленных результатов лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с. [Statistics of malignant neoplasms in Russia and CIS countries in 2012. Eds.: M.I. Davydov, E.M. Axel'. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs, 2014. 226 p. (In Russ.)].
2. McGraw J., Waller D. Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012;8(3):371–82.
3. Gonzalez F.J., Mackenzie P.I., Kimura S., Nebert D.W. Isolation and characterization of mouse full-length cDNA and genomic clones of 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome P1-450 and P3-450. *Gene* 1984;29(3):281–92.
4. Nebert D.W., Adesnik M., Coon M.J. et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987;6(1):1–11.
5. Nelson D.R. Cytochrome P450 gene superfamily. Available at: drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html (Accessed July 10, 2002).
6. Phillips K.A., Veenstra D.L., Oren E. et al. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 2001;286(18):2270–9.
7. Andersson T., Flockhart D.A., Goldstein D.B. et al. Drug-metabolizing enzymes: evidence for clinical utility of pharmacogenomic tests. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78(6):559–81.
8. Franceschi M., Scarcelli C., Niro V. et al. Prevalence, clinical features and avoidability of adverse drug reactions as cause of admission to a geriatric unit: a prospective study of 1756 patients. *Drug Saf* 2008;31(6):545–56.
9. Lazarou J., Pomeranz B.H., Corey P.N. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279(15):1200–5.
10. Goldhirsch A., Wood W.C., Gelber R.D. et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2007;18(7):1133–44.
11. Davies C., Pan H., Godwin J. et al. Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomized trial. *Lancet* 2013;381(9869):805–16.
12. Gray R.G., Rea D.W., Handley K. et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years in 6,953 women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(18S):5.
13. Lim Y.C., Desta Z., Flockhart D.A., Skaar T.C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxytamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55(5):471–8.
14. Crewe H.K., Ellis S.W., Lennard M.S., Tucker G.T. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1997;53(2):171–8.
15. Murdter T.E., Schroth W., Bacchus-Gerybadze L. et al. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(5):708–17.
16. Wu X., Hawse J.R., Subramaniam M. et al. The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2009;69(5):1722–7.
17. de Vries Schultink A.H., Zwart W., Linn S.C. et al. Effects of pharmacogenetics on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tamoxifen. *Clin Pharmacokinet* 2015;54(8):797–810.
18. Mwinyi J., Vokinger K., Jetter A. et al. Impact of variable CYP genotypes on breast cancer relapse in patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73(6):1181–8.
19. Eichelbaum M., Ingelman-Sundberg M., Evans W.E. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 2006;57:119–37.
20. Evans W.E., Relling M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286(5439):487–91.
21. Nebert D.W., Jorge-Nebert L.F. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. In book: Emery and rimoin's principles and practice of medical genetics. 4th edn. Eds.: D.L. Rimoin, J.M. Connor, R.E. Pyeritz, B.R. Korf. Edinburgh: Harcourt Brace, 2002. Pp. 590–631.
22. Crewe H.K., Notley L.M., Wunsch R.M. et al. Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 40 -hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metabolism Dispos* 2002;30(8):869–74.
23. Desta Z., Ward B.A., Soukhova N.V., Flockhart D.A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(3):1062–75.
24. Maximov P.Y., McDaniel R.E., Fernandes D.J. et al. Simulation with cells in vitro of tamoxifen treatment in premenopausal breast cancer patients with different CYP2D6 genotypes. *Br J Pharmacol* 2014;171(24):5624–35.
25. Johnson M.D., Zuo H., Lee K.H. et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2004;85(2):151–9.
26. Bradford L.D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 2001;3(2):229–43.
27. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005;5(1):6–13.
28. Zanger U.M., Raimundo S., Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2004;369(1):23–37.
29. Goetz M.P., Rae J.M., Suman V.J. et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005;23(36):9312–8.
30. Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature T. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Data-

- base. Available at: www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm. (Accessed Dec 28, 2014).
31. Gaikovitch E.A., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M. et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59(4):303–12.
 32. Кольман Я., Рём К.Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000. 470 с. [Kohlmann I., Rem K.G. Visible biochemistry. Moscow: Mir, 2000. 470 p. (In Russ.)].
 33. Сычев Д.А., Миронова Н.А. Фармакогенетическое тестирование по CYP2D6 и CYP2C19: значение для персонализации применения лекарственных средств в клинической практике. *Лаборатория* 2012;(4):11–3. [Sychev D.A., Mironova N.A. Pharmacogenetic testing for CYP2D6 and CYP2C19: a value for personalizing the use of drugs in clinical practice. *Laboratoriya = Laboratory* 2012;(4):11–3. (In Russ.)].
 34. Zhou S.F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part II. *Clin Pharmacokinet* 2009;48(12):761–804.
 35. Borges S., Desta Z., Li L. et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol* 2006;80(1):61–74.
 36. Lim H.S., Ju Lee H., Seok Lee K. et al. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(25):3837–45.
 37. Madlensky L., Natarajan L., Tchu S. et al. Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(5):718–25.
 38. Schroth W., Goetz M.P., Hamann U. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA* 2009;302(13):1429–36.
 39. Regan M., Leyland-Jones B., Bouzyk M. et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(6):441–51.
 40. Rae J.M., Drury S., Hayes D.F. et al. ATAC trialists: CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(6):452–60.
 41. Nakamura Y., Ratain M.J., Cox N.J. CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the Breast International Group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(16):1264.
 42. Dezentjé V.O., van Schaik R.H., Vletter-Bogaartz J.M. et al. CYP2D6 genotype in relation to tamoxifen efficacy in a Dutch cohort of the tamoxifen exemestane adjuvant multinational (TEAM) trial. *Breast Cancer Res Treat* 2013;140(2):363–73.
 43. Goetz M.P., Suman V.J., Hoskin T.L. et al. CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSCG) 8. *Clin Cancer Res* 2013;19(2):500–7.
 44. Karle J., Bolbrinker J., Vögl S. et al. Influence of CYP2D6-genotype on tamoxifen efficacy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139(2):553–60.
 45. Zeng Z., Liu Y., Liu Z. CYP2D6 polymorphisms influence tamoxifen treatment outcomes in breast cancer patients: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72(2):287–303.
 46. Irvin W.J. Jr, Walko C.M., Weck K.E. et al. Genotype-guided tamoxifen dosing increases active metabolite exposure in women with reduced CYP2D6 metabolism: a multicenter study. *J Clin Oncol* 2011;29(24):3232–9.
 47. Kiyotani K., Mushiroda T., Imamura C.K. et al. Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012;131(1):137–45.
 48. Rolla R., Vidalí M., Meola S. et al. Side effects associated with ultrarapid cytochrome P450 2D6 genotype among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *Clin Lab* 2012;58(11–12):1211–8.
 49. Barginear M.F., Jaremko M., Peter I. et al. Increasing tamoxifen dose in breast cancer patients based on CYP2D6 genotypes and endoxifen levels: effect on active metabolite isomers and the antiestrogenic activity score. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90(4):605–11.
 50. Brauch H., Schroth W., Goetz M.P. et al. Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. *J Clin Oncol* 2013;31(2):176–80.
 51. Fann J.R., Thomas-Rich A.M., Katon W.J. et al. Major depression after breast cancer: a review of epidemiology and treatment. *Gen Hosp Psychiatry* 2008;30(2):112–26.
 52. Jeppesen U., Gram L.F., Vistisen K. et al. Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;51(1):73–8.
 53. Binkhorst L., Bannink M., de Bruijn P. et al. Augmentation of endoxifen exposure in tamoxifen-treated women following SSRI switch. *Clin Pharmacokinet* 2016;55(2):249–55.
 54. Borges S., Desta Z., Jin Y. et al. Composite functional genetic and comedication CYP2D6 activity score in predicting tamoxifen drug exposure among breast cancer patients. *J Clin Pharmacol* 2010;50(4):450–8.
 55. Jin Y., Desta Z., Stearns V. et al. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(1):30–9.
 56. Stearns V., Johnson M.D., Rae J.M. et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(23):1758–64.
 57. Chubak J., Buist D.S., Boudreau D.M. et al. Breast cancer recurrence risk in relation to antidepressant use after diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112(1):123–32.
 58. Lehmann D., Nelsen J., Ramanath V. et al. Lack of attenuation in the antitumor effect of tamoxifen by chronic CYP isofor inhibition. *J Clin Pharmacol* 2004;44(8):861–5.
 59. Stingl J.C., Parmar S., Huber-Wechselberger A. et al. Impact of CYP2D6*4 genotype on progression free survival in tamoxifen breast cancer treatment. *Curr Med Res Opin* 2010;26(11):2535–42.
 60. Bijl M.J., van Schaik R.H., Lammers L.A. et al. The CYP2D6*4 polymorphism affects breast cancer survival in tamoxifen users. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118(1):125–30.
 61. Schroth W., Antoniadou L., Fritz P. et al. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 2007;25(33):5187–93.
 62. Martins D.M., Vidal F.C., Souza R.D. et al. Determination of CYP2D6 *3, *4, and *10 frequency in women with breast cancer in São Luís, Brazil, and its association with prognostic factors and disease-free survival. *Braz J Med Biol Res* 2014;47(11):1008–15.
 63. Nowell S., Ahn J., Rae J.M. et al. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91(3):249–58.
 64. Wegman P., Elingarami S., Carstensen J. et al. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007;9(1):7.
 65. Swen J.J., Nijenhuis M., de Boer A. Pharmacogenetics: from bench to byte – an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(5):662–73.
 66. Tamoxifen background summary Draft. Available at: www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4248b1-01-fda-tamoxifen-background-summary-final.pdf (Accessed September 15, 2006).

Трансформирующий фактор роста бета-1 в онкогенезе аденокарциномы легкого человека

В.Е. Шевченко¹, И.С. Брюховецкий^{2,3}, З.Н. Никифорова¹, С.В. Ковалев⁴, И.А. Кудрявцев¹, Н.Е. Арноцкая¹

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

²Школа биомедицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет»; Россия, 690091 Владивосток, ул. Суханова, 8;

³ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН; Россия, 690059 Владивосток, ул. Пальчевского, 17;

⁴химический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Трансформирующий фактор роста бета-1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1) является одним из наиболее важных тканевых факторов, секретируемых при развитии эпителиальных опухолей. Повышенная экспрессия TGF- β 1 в злокачественных опухолях легких способствует ангиогенезу, супрессии иммунной системы, а также выживанию раковых клеток, увеличивая их рост, миграцию, инвазию.

Цель работы – изучение молекулярных механизмов действия TGF- β 1 на клетки A549 аденокарциномы легкого человека методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Результаты. Идентифицированы некоторые внутриклеточные сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе немелкоклеточного рака легкого и включающие, в том числе, дифференциально экспрессированные белки семейств куллинов, онкогенов ETS, диацелаз гистонов, циклинзависимых киназ, сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K).

Заключение. Установлены важные закономерности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования рака легкого и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

Ключевые слова: трансформирующий фактор роста бета-1, аденокарцинома легкого, протеом, масс-спектрометрия, эпителиально-мезенхимальный переход

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-67-74

The transforming growth factor beta-1 in the oncogenesis of human lung adenocarcinoma

V.E. Shevchenko¹, I.S. Bryukhovetskiy^{2,3}, Z.N. Nikiforova¹, S.V. Kovalev⁴, I.A. Kudryavtsev¹, N.E. Arnotskaya¹

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

²Biomedicine School, Far Eastern Federal University; 8 Sukhanova St., Vladivostok 690091, Russia;

³National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences; 17 Pal'chevskogo St., Vladivostok 690059, Russia;

⁴Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Build. 3, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. The transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) is one of the most important tissue factors secreted by the development of epithelial tumors. Increased expression of TGF- β 1 in lung tumors promotes cancer cells survival enhancing their growth, migration, invasion, angiogenesis, immune system suppression.

Objective: to study molecular mechanisms of TGF- β 1 action on A549 human lung adenocarcinoma cells by means of proteomic high-resolution mass spectrometry.

Results. Intracellular signaling pathways responsible for the involvement of TGF- β 1 in the oncogenesis of non-small cell lung cancer have been found, which include the differential expressed proteins of the families of cullin, ETS oncogenes, histone diacelases, cyclin-dependent kinases, and the signaling pathway phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).

Conclusions. Important patterns are determined that could be used for the development of new approaches for detection of lung cancer metastasis candidate markers and potential therapy targets of this disease.

Key words: transforming growth factor beta 1, lung adenocarcinoma, proteome, mass-spectrometry, epithelial-mesenchymal transition

Введение

Рак легкого (РЛ) занимает одно из первых мест в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей во всем мире [1, 2]. Немелкоклеточный РЛ (НМРЛ) является основным гистологическим подтипом (~80 %) этого заболевания и часто коррелирует с метастазированием опухоли. При НМРЛ метастазы в лимфатические узлы и инвазия опухолевых клеток в соседние органы считаются наиболее важными показателями неблагоприятного прогноза [3]. Поэтому в последнее время уделяется повышенное внимание изучению сигнальных путей, вовлеченных в процесс метастазирования РЛ. Лучшее понимание молекулярных механизмов онкогенеза РЛ, идентификация молекулярных детерминант и маркеров метастатической активности раковых клеток в конечном счете обеспечат новые и эффективные методы лечения этого заболевания.

Несмотря на то что многие исследователи изучали генетические и молекулярные особенности РЛ для разработки более совершенных методов лечения, терапия РЛ по-прежнему остается сложной проблемой из-за взаимодействия между раковыми клетками и окружающей микросредой. Клетки РЛ, как и некоторые другие трансформированные клетки, часто подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП), иногда при участии фибробластов [4]. При ЭМП эпителиальные клетки теряют свои межклеточные контакты и апикальную базальную полярность, реорганизуют свой цитоскелет, секретируют протеины внеклеточного матрикса, и, таким образом, трансдифференцируются в мезенхимальные подвижные клетки [5].

Индукция ЭМП приводит к изменению пластичности в архитектуре эпителиальных тканей и метастатической инвазивности многих карцином, однако до конца его роль остается неясной. Недавние исследования связывают ЭМП с генерацией опухолевых стволовых клеток [6]. Стромальные клетки РЛ секретируют такие молекулы, как трансформирующий фактор роста бета 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1), которые вызывают ЭМП в опухолевых клетках, облегчая их инвазию, стволовость и метастазирование. TGF- β 1 — один из наиболее важных тканевых факторов, секретируемых при развитии эпителиальных опухолей. Он может вызывать прогрессию и метастазирование опухоли по аутокринному механизму, подавляя иммунитет, усиливая ангиогенез и деградацию внеклеточного матрикса [7, 8]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что активация TGF- β 1-пути является одной из основных причин неблагоприятного прогноза [9]. Показано, что у больных РЛ повышены уровни TGF- β 1 в плазме крови как исходные, так и после лучевой терапии [10].

Свои различные эффекты TGF- β 1 осуществляет через сложную сеть лиганд-рецепторных взаимодействий, проводящих соответствующие сигналы. В кан-

церогенезе TGF- β 1 может выполнять двойную роль: в зависимости от стадии и типа опухоли он действует как супрессор опухоли или как канцерогенный фактор. Такое переключение от опухолевой супрессии к онкогенной активности также известно как «парадокс TGF- β » [11]. Несмотря на заметный прогресс в изучении TGF- β -сигнального пути, его роль в онкогенезе РЛ недостаточно ясна. Существующие в настоящее время данные указывают на важную роль TGF- β -сигнального пути на поздних этапах развития опухолевого процесса при РЛ, включая метастазирование, и делают его потенциальным кандидатом для таргетной терапии.

Цель работы — изучение молекулярных механизмов действия TGF- β 1 на линию клеток A549 аденокарциномы легкого человека методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения. Впервые идентифицирован ряд внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за участие TGF- β 1 в онкогенезе НМРЛ, что позволило обнаружить новые потенциальные маркеры метастазирования, мишени для таргетной терапии РЛ, часть из которых в перспективе может быть провалидирована и использована в практической медицине при разработке новых подходов для диагностики и терапии НМРЛ — одного из наиболее тяжелых онкологических заболеваний.

Экспериментальная часть

Клеточные культуры. Клетки линии A549 аденокарциномы легкого человека (American Type Culture Collection, США) культивировали в пластиковых флаконах 75 см² (Corning Costar, США) при температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в среде RPMI-1640 с глутамином, с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). При достижении 70 % монослоя при смене среды в контрольные флаконы с клетками добавляли 75 мкл фосфатного буферного раствора (ФБР), в опытные флаконы вносили в том же объеме TGF- β 1 в ФБР в концентрации 5 нг/мл и инкубировали в течение 72 ч. Клетки снимали раствором Версена (1 мл) и дважды отмывали ФБР (1 мл) центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин. Все клеточные линии выращивали в 3 экземплярах, независимо обрабатывали и анализировали.

Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа. Трипсинолиз высушенных лизатов проводили по ранее описанной методике [12]. По 4 мкл растворов полученных пептидов анализировали масс-спектрометрически для контроля проведения трипсинолиза [12]. По окончании реакции содержимое пробирок упаривали досуха при температуре 30 °С на центрифужном испарителе CentriVar (Labconco, США), а затем подвергали лиофильной сушке в течение ночи для полного удаления бикарбоната аммония.

Триптические пептиды растворяли в подвижной фазе А (30 % ацетонитрила (ACN), 70 % воды, 0,1 % муравьиной кислоты, pH 2,7) с таким расчетом, чтобы в 20 мкл раствора содержалось 100 мкг общего белка, и разделяли на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды), снабженном коллектором фракций, на катионообменной колонке MIC-10-CP (материал Poros 10S, 1 мм × 10 см, Dionex) [12]. Полученные 24 фракции упаривали досуха при температуре 30 °С на центрифужном испарителе и перерастворяли в 100 мкл 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили на нанопоточном хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Нидерланды), соединенном с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo, США) и снабженном электроспрейным источником ионизации. Хроматографирование пептидов осуществляли на колонке Acclaim C18 PepMap100 (75 мкм × 150 мм, размер зерна 3 мкм, Dionex), снабженной предколонкой Acclaim C18 PepMap (300 мкм × 5 мм, размер зерна 5 мкм). Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 300–2000 Да [12].

Для идентификации белков использовали программу MaxQuant v1.5.2.8. Количественный расчет проводили методом *label-free* (без метки) для всех обнаруженных пептидов. Таблицу полученных белков обрабатывали в программе Perseus v1.5.1.6 для аннотирования и удаления белков-контаминантов и ложноположительных идентификаций, а также для определения статистической значимости различий в уровнях белков, полученных методом *label-free*. Значимыми считали различия при уровне достоверности $p < 0,05$ для парного t -критерия Стьюдента.

Результаты

Как было сказано, в работе использовали *label-free* количественный протеомный метод нано-ВЭЖХ-МС/МС для детектирования и сравнения дифференциально экспрессированных белков (ДЭБ) в лизатах линии клеток аденокарциномы легкого человека A549 до и после обработки их TGF- β 1. Анализ триптических пептидов по их МС/МС-спектрам с помощью программного пакета MaxQuant идентифицировал 2402 протеина по 15 597 (13 246 уникальным) пептидам при сравнении с данными базы SwissProt_human и ложным уровнем обнаружения (false discovery rate, FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. Из них 2209 белков идентифицировали по 15 090 (12 764 уникальных) пептидам в контрольных клетках A549, 2135 — по 14 898 (12 582 уникальных) пептидам в клетках A549 после стимуляции TGF- β 1. Для всех линий клеток ~92 % белков идентифицировали по 2 и более пептидам. Коэффициент корреляции Пирсона для данных от образцов клеток A549 до и после стимуляции TGF- β 1 изменялся от 0,894 до 0,960.

Идентифицированные протеины показали высокий процент перекрытия для 2 клеточных популяций.

Во всех клеточных лизатах детектировались 1942 белка (81 % от 2402), 267 протеинов — только в контрольных клетках A549 и 193 протеина были уникальными для клеток A549 после их стимуляции TGF- β 1.

Статистически значимые ($p < 0,05$) изменения в экспрессии после обработки клеток TGF- β 1 зарегистрировали для 632 белков, из них 537 протеинов изменяли экспрессию более чем в 2 раза, 234 — увеличивали, а 303 — уменьшали. Эти белки рассматривали как дифференциально экспрессированные. Повышение экспрессии более чем на порядок наблюдали у 110 ДЭБ и более чем в 100 раз у 7 ДЭБ с индексами генов TRHDE, ZFR, EVI5, GVINP1, VPS8, MAP7D2, CNTRL. Снижение экспрессии после обработки TGF- β 1 клеток A549 более чем в 10 раз зарегистрировали у 30 белков, среди которых BRK1, PC4, CHD4, ASPH, SNRPG.

В табл. 1, построенной с использованием энциклопедии метаболических путей KEGG PATHWAY (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и GO (Gene Ontology) биологических процессов, представлен список из 24 идентифицированных ДЭБ, участвующих в канцерогенезе. Как видно из табл. 1, при действии TGF- β 1 увеличивали экспрессию более чем в 2 раза 8 протеинов и снижали — 16. Обнаружены 11 протеинов, участвующих в онкогенезе НМРЛ, и 10 белков для мелкоклеточного РЛ. Из них 3 белка, кодируемые генами *CDK4*, *CDK6* и *PIK3CA*, относились к обеим гистологическим формам РЛ. При действии TGF- β 1 на клетки A549 экспрессия циклинзависимой киназы 4 и 6 (cyclin-dependent kinases 4, 6, CDK4, 6) снижалась в 5,51 и 4,94 раза соответственно, тогда как экспрессия каталитического альфа полипептида фосфатидилинозитол-3-киназы увеличивалась в 23,14 раза.

ДЭБ классифицировали в соответствии с их биологической ролью в клетке с помощью протеомно-геномной аналитической программы PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships, www.pantherdb.org). Число протеинов в каждой категории биологического процесса, увеличивающих (Up) или уменьшающих (Down) экспрессию в клетках A549 после их стимуляции TGF- β 1, представлена в табл. 2. В среднем отношение Up/Down составляет 0,72, указывая на то, что снижение экспрессии превалирует над ее повышением у идентифицированных белков практически во всех категориях биологических процессов при действии TGF- β 1. Только для процессов, связанных с ответом на стимулы и репродукцией, число Up- и Down-протеинов сравнивается.

Обсуждение

Цитокин TGF- β 1 играет важную роль в эпителиальном онкогенезе [13–16]. На ранних стадиях онкогенеза TGF- β 1, как правило, функционирует как опухолевый супрессор. На более поздних этапах, однако, когда опухоли растут и прогрессируют, TGF- β 1 синтезируется как раковыми, так и стромальными клетками в пределах микросреды опухоли как естественный

Таблица 1. Дифференциально экспрессированные белки, участвующие в канцерогенезе

Индекс гена	Белок	Немелкоклеточный рак легкого	Мелкоклеточный рак легкого	Участие в канцерогенезе	A549 + TGF-β1/A549
APPL1	Адапторный протеин взаимодействия фосфотирозина			+	0,27
BAX	Ассоциированный с BCL-2 протеин X			+	0,12
BIRC2	Бакуловирусный IAP протеин 2, содержащий повтор		+	+	2,24
CDC42	Белок 42 клеточного цикла деления			+	0,24
CUL2	Куллин 2			+	10,37
CDK4	Циклинзависимая киназа 4	+	+	+	0,18
CDK6	Циклинзависимая киназа 6	+	+	+	0,20
CRKL	Гомолог протеина онкогена <i>v-crk</i> вируса саркомы CT10			+	0,16
CTBP1	C-терминальный связывающий протеин 1			+	2,37
CTNNA1	Катенин альфа 1			+	0,10
ETS1	Гомолог 1 онкогена <i>v-ets</i> вируса эритробластоэза E26			+	69,41
HDAC1	Диацетилаза гистонов 1			+	0,08
HDAC2	Диацетилаза гистонов 2			+	0,22
ITGB1	Интегрин бета 1		+	+	0,14
MAPK1	Митогенактивируемая протеинкиназа 1	+		+	0,54
MAP2K2	Митогенактивируемая протеинкиназа 2	+		+	0,41
MSH2	mutS гомолог 2			+	2,62
NRAS	Гомолог онкогена RAS нейробластомы	+		+	0,43
PIK3CA	Каталитический альфа-полипептид фосфатидилинозитол-3-киназы	+	+	+	23,14
RHOA	Гомолог семейства RAS, член A			+	2,10
RAC1	Гуанозинтрифосфатсвязывающий протеин RAC1			+	0,54
TCEB1	Полипептид 1 фактора В элонгации транскрипции			+	4,10
TCEB2	Полипептид 2 фактора В элонгации транскрипции			+	0,40
TPR	Белок транслоцированной промоторной области			+	0,54

ответ на гипоксию и воспаление и может выступать в качестве мощного промоутера нескольких этапов метастатического процесса. К ним относятся не только локальная подвижность/инвазия и поступление раковых клеток в кровотоки (интравасация), но также их выход из кровеносных сосудов (экстравазация) и выживание в отдаленных органах [17–20]. Значение TGF-β1 в прогрессировании заболевания особенно велико в опухолях, в которых раковые клетки сохраняют основные компоненты TGF-β1-сигналинга (рак молочной железы (PMЖ) и РЛ) [14, 21]. Действительно, при НМРЛ – наиболее распространенном гистологическом подтипе РЛ с высоким уровнем смертности – увеличение экспрессии TGF-β1 коррелирует с прогрессией опухоли и плохой выживаемостью пациентов. Различные экспериментальные модельные

системы подтверждают мнение о прометастатической роли TGF-β1 в этих опухолях [22–25]. Тем не менее одной из основных нерешенных задач остается идентификация генов-мишеней для TGF-β1, которые управляют различными стадиями метастазирования, тем более что TGF-β1 модулирует экспрессию генов по-разному в зависимости от типа клеток [26, 27]. Несмотря на определенный прогресс в контексте метастазов PMЖ, гены и механизмы, которые опосредуют прометастатические эффекты TGF-β1 при НМРЛ, остаются в значительной степени неизвестными.

Как видно из табл. 1, TGF-β1 оказывает существенное влияние на экспрессию ряда белков, связанных с канцерогенезом, которые могут являться потенциальными мишенями для таргетной терапии РЛ. В частности, TGF-β1 модулирует экспрессию куллинов

Таблица 2. Число протеинов в каждой категории биологического процесса, увеличивающих или уменьшающих экспрессию в клетках A549 после их стимуляции TGF- β 1

Категория биологического процесса	Онтология генов (Gene Ontology, GO)	Число протеинов	Число протеинов, увеличивающих экспрессию (Up)	Число протеинов, снижающих экспрессию (Down)	Up/Down
Метаболический	GO:0008152	337	132	205	0,64
Клеточный	GO:0009987	225	92	133	0,69
Биологическая регуляция	GO:0065007	94	42	52	0,81
Локализация	GO:0051179	86	34	52	0,65
Организация или биогенез клеточных компонентов	GO:0071840	80	28	52	0,54
Развитие	GO:0032502	70	28	42	0,67
Отклик на стимулы	GO:0050896	36	18	18	1,00
Многоклеточные организмы	GO:0032501	37	15	22	0,68
Иммунные	GO:0002376	27	12	15	0,80
Апоптотический	GO:0006915	16	6	10	0,60
Репродуктивный	GO:0000003	8	4	4	1,00
Адгезия	GO:0022610	9	3	6	0,50

(cullins) – семейство гидрофобных белков, служащих скэффолдом для убиквитинлигаз (E3). Они в сочетании с RING-белками образуют куллин-RING-убиквитинлигазы (CRL), которые играют важную роль во многих клеточных процессах. Нами идентифицированы 5 (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5) из 8 членов этого семейства. У человека функциональные изменения этого семейства убиквитинлигаз связаны с заболеваниями мышц, метаболическими нарушениями и раком [28]. Наиболее известным субстратом, распознающим рецептор CRL2, является опухолевый супрессор – белок VHL, который мутирует при синдроме фон Хиппеля–Линдау (VHL) [29]. При действии TGF- β 1 (см. табл. 1) экспрессия CUL2 увеличивалась в 10,37 раза. В последнее время появилось значительное число исследований, проливающих свет на биологические функции CUL3 E3-лигазы, которая регулирует прогрессирование опухолевого процесса и терапевтический ответ. В частности, Keap1, KLHL20 и SPOP являются наиболее известными субстратными адаптерами для CUL3 при ее воздействии на различные виды рака. Эти 3 белка опосредуют CUL3-зависимое убиквитинирование ряда субстратов при инициации опухолевого процесса, его прогрессировании и терапевтическом ответе [30]. Нами отмечено увеличение экспрессии CUL3 в 5,22 раза.

ETS1 входит в семейство онкогенов ETS, члены которого обладают характерным ДНК-связывающим доменом (домен ETS) из 85 аминокислот [31]. Белок ETS1 контролирует уровни экспрессии множества генов, включая факторы транскрипции, протеазы, гены

клеточного цикла, гены, регулирующие апоптоз, цитокины и факторы роста [32]. Повышенная активность ETS1 наблюдалась при РМЖ, РЛ, раке яичников, ободочной и прямой кишки и меланоме [33–37]. ETS1 сверхэкспрессируется при инвазивном РМЖ и коррелирует с его плохим прогнозом [38]. Высокая экспрессия ETS1 способствует миграции раковых клеток, инвазии и анкернезависимому росту, в то же время низкая экспрессия ETS1 снижала адгезию клеток HeLa [39]. TGF- β 1 увеличивал экспрессию ETS1 в клетках A549 в 69,41 раза (см. табл. 1).

Дерегуляция сигналинга фосфатидилинозитол-3-киназы (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) имеет решающее значение для многих злокачественных опухолей человека, несмотря на то, что для нормальной пролиферации клеток требуется адекватная функциональность этого каскада. Хотя ряд ингибиторов PI3K-пути находятся на клинических испытаниях или одобрены для противоопухолевой терапии, все еще неясна роль функциональной активности членов этого каскада при конкретных злокачественных опухолях. При РЛ PI3K-путь часто aberrантно активируется мутацией генов, кодирующих белки EGFR, KRAS и PIK3CA [40]. При действии TGF- β 1 на клетки A549 (см. табл. 1) наблюдалось значительное увеличение (в 23,14 раза) экспрессии протеина PIK3CA, что может указывать на тесную взаимосвязь TGF- β 1 с PI3K-сигнальными путями и должно учитываться при выборе мишеней для таргетной терапии НМРЛ.

При многих видах рака положительно регулируются несколько генов, связанных с онкогенезом

и опухолевой прогрессией, а супрессорные гены подавляются. Одним из факторов, регулирующих эти процессы, является экспрессия генов посттрансляционной модификации гистонов. Метилирование и ацетилирование гистонов — хорошо известные посттрансляционные модификации. В последнее время повышенное внимание уделяется метилированию и ацетилированию гистонов при лечении рака [41, 42]. Диацетилазы гистонов (histone deacetylases, HDACs) часто сверхэкспрессированы при онкологических заболеваниях, в последние годы они стали основной терапевтической мишенью [43]. Повышенная экспрессия HDACs может привести к глушению транскрипции генов и aberrантной транскрипции из-за измененной экспрессии/мутации генов, кодирующих гистонацетилазу (HAT), HDAC-ферменты или их связывающих партнеров, и тесно сопряжена с канцерогенезом. Это происходит при многих злокачественных опухолях у человека, указывая на то, что активность aberrантного эпигенетического ацетилирования связана с развитием рака [44–46]. Полагают, что последовательные стадии ЭМП и мезенхимально-эпителиального перехода, происходящие в процессе опухолевой прогрессии, могут быть обратимыми и связаны с эпигенетическими изменениями.

В нескольких исследованиях отмечен эффект ингибиторов HDAC на SMAD4. А. Kaimori и соавт. показали, что ингибирование гистондеацетилазы подавляет TGF- β -индуцированный ЭМП в гепатоцитах путем ингибирования транслокации SMAD4 в ядро [47]. С. L. Chung и соавт. показали, что ингибитор HDAC — м-карбоксихиннаминовая кислота — ингибирует транслокацию в ядро SMAD4 в плевральных мезотелиальных клетках человека [48]. Анализ полученных нами данных неожиданно выявил снижение экспрессии HDAC1 (в 12,87 раза), HDAC2 (в 4,64 раза) и уровня HAT1 (в 3,06 раза) при действии TGF- β 1 на клетки A549. Полученный эффект требует дополнительного исследования.

CDK — группа белков, регулируемых циклином и циклиноподобными молекулами. Большинство CDK участвуют в смене фаз клеточного цикла, регулируют транскрипцию и процессинг матричной (мРНК). CDK — серин/треониновые киназы, фосфорилируют соответствующие аминокислотные остатки в белках. Известны несколько CDK, каждая из которых активируется одним или более циклинами и иными подобными молекулами. Aberrантная регуляция клеточного цикла является отличительной чертой рака [49]. Активность CDK4/6 дерегулирована в результате различных генетических изменений во многих злокачественных опухолях человека. Они включают мутации генов *CDK4* и *CDK6*, амплификацию генов, кодирующих циклины D-типа, делецию или сайленсинг *CDKN2A/B*-генов, кодирующих INK4-ингибиторы p16 и p15 [50]. Такое дерегулирование имеет решающее значение для различных процессов онкогенной

трансформации, на что указывает высокая активность CDK4/6 во многих раковых клетках [51]. Ранее установлено, что CDK4/6-ингибитор PD-0332991 увеличивал SMAD-транскрипционную активность, индуцировал ЭМП, усиливал экспрессию метастатических генов [52]. При инициации ЭМП в клетках A549 TGF- β 1 наблюдалось снижение активности CDK4 и CDK6 в 5,51 и 4,94 раза соответственно (см. табл. 1). Экспрессия CDK5 и CDK9 также снижалась в 1,50 и 3,43 раза соответственно, тогда как уровни ингибитора CDK1 возрастали в 1,59 раза, а протеина 1, ассоциированного с CDK2, — в 8,53 раза. Эти данные указывают на то, что ингибирование активности CDK4/6 может частично активировать TGF- β -сигнальный каскад и способствовать протеканию процесса ЭМП.

Полипептид 1 фактора В (SII) элонгации транскрипции (transcription elongation factor В (SII), polypeptide 1; TCEB1) выполняет несколько функций в клетке. Он является частью комплекса Elongin (SIII), который работает как активатор транскрипции [53]. В цитоплазме клеток TCEB1 входит в состав белкового комплекса VHL, таргетирующего онкоген *HIF-1 α* [54]. S. E. Jalava и соавт. показали, что уменьшение экспрессии TCEB1 приводило к снижению инвазии и метастазирования клеток рака предстательной железы [55]. При действии TGF- β 1 на клетки A549 мы наблюдали увеличение его уровней в 4,1 раза (см. табл. 1). Одновременно отмечали повышение экспрессии в 2,46 раза ADAM9, опосредующего его эффект [55].

Цинк-пальцевые белки, кодируемые с участием протеина, связывающего цинк-пальцевую РНК (ZFR), играют важную роль в связывании ДНК и регулировании процессов роста и развития [56]. Человеческий ZFR, по-видимому, участвует в регулировании альтернативного сплайсинга пре-мРНК [56]. Нокаут ZFR инициирует арест клеточного цикла в фазе G0/G1 и супрессирует миграцию и инвазию клеток PANC-1 рака поджелудочной железы [56]. Действие TGF- β 1 вызывает гиперэкспрессию (в 339,82 раза) ZFR в клетках A549. Одновременно зарегистрировано увеличение уровней цинк-пальцевого белка 578 (ZNF578) в 25,11 раза. Оба белка могут рассматриваться как потенциальные мишени для таргетной терапии НМРЛ.

Связь протеина сайта 5 экотропной вирусной интеграции (Evi5) с регуляцией клеточного цикла и миграцией клеток предполагает его участие в патологии некоторых заболеваний. Однако прямые доказательства роли Evi5 в онкогенезе или подавлении туморогенеза пока отсутствуют [57]. Инкубация TGF- β 1 с клетками A549 приводит к увеличению экспрессии Evi5 в 213,09 раза, что указывает на его тесную связь с TGF- β 1-сигналингом и требует дальнейшего изучения.

Заключение

Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучены молекулярные механизмы действия TGF- β 1 на клетки A549 аденокарци-

номы легкого человека. Впервые обнаружены не описанные ранее сигнальные пути, ответственные за участие TGF- β 1 в онкогенезе НМРЛ, которые включают ДЭБ семейств куллинов, онкогенов ETS, диацелаз гистонов, CDK, цинк-пальцевых белков. Особый интерес представляют белки ZFR и Evi5, экспрессия которых в клетках A549 под действием

TGF- β 1 увеличивается в сотни раз. Требуются дополнительные исследования для понимания их роли в онкогенезе РЛ. Полученные нами данные могут использоваться при разработке новых подходов для обнаружения кандидатных маркеров метастазирования НМРЛ и потенциальных мишеней для терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10–29.
- Liotta L.A., Steeg P.S., Stetler-Stevenson W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64(2):327–36.
- Ganti A.K., Huang C.H., Klein M.A. et al. Lung cancer management in 2010. *Oncology (Williston Park)* 2011;25(1):64–73.
- Kojima Y., Acar A., Eaton E.N. et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(46):20009–14.
- Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119(6):1420–8.
- Morel A.P., Lievre M., Thomas C. et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3(8):e2888.
- Miyazono K., Ehata S., Koinuma D. Tumor-promoting functions of transforming growth factor- β in progression of cancer. *Ups J Med Sci* 2012;117(2):143–52.
- Ikushima H., Todo T., Ino Y. et al. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009;5(5):504–14.
- Zhao L., Ji W., Zhang L. et al. Changes of circulating transforming growth factor-beta1 level during radiation therapy are correlated with the prognosis of locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(4):521–5.
- Dancea H.C., Shareef M.M., Ahmed M.M. Role of radiation-induced TGF-beta signaling in cancer therapy. *Mol Cell Pharmacol* 2009;1(1):44–56.
- Rahimi R.A., Leof E.B. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem* 2007;102(3):593–608.
- Шевченко В.Е., Ковалев С.В., Арноцкая Н.Е. и др. Молекулярные детерминанты действия трансформирующего фактора роста бета-1 на клетки глиобластомы человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(2):50–9.
- [Shevchenko V.E., Kovalev S.V., Arnotskaya N.E. et al. Molecular determinants of transforming growth factor beta-1 action on human glioblastoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(2):50–9. (In Russ.)].
- Derynck R., Akhurst R.J., Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29(2):117–29.
- Elliott R.L., Blobel G.C. Role of transforming growth factor b in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2078–93.
- Padua D., Massague J. Roles of TGF- β in metastasis. *Cell Res* 2009;19:89–102.
- Jakowlew S.B. Transforming growth factor- β in lung cancer, carcinogenesis, and metastasis. In: *The tumor microenvironment*. Ed. R.G. Bagley. 2010. Pp. 633–671.
- Ma C., Rong Y., Radloff D.R. et al. Extracellular matrix protein big-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev* 2008;22(3):308–21.
- Giampieri S., Manning C., Hooper S. et al. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 2009;11(11):1287–96.
- Labelle M., Begum S., Hynes R.O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011;20(5):576–90.
- Yuan J.H., Yang F., Wang X. et al. A long noncoding RNA activated by TGF- β promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2014;25(5):666–81.
- Hasegawa Y., Takanashi S., Kanehira Y. et al. Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;91(5):964–71.
- Toonkel R.L., Borczuk A.C., Powell C.A. TGF- β signaling pathway in lung adenocarcinoma invasion. *J Thorac Oncol* 2010;5(2):153–7.
- Vázquez P.F., Carlini M.J., Daroqui M.C. et al. TGF- β specifically enhances the metastatic attributes of murine lung adenocarcinoma: implications for human non-small cell lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 2013;30(8):993–1007.
- Massague J. TGF- β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(10):616–30.
- Michl P., Ramjaun A.R., Pardo O.E. et al. CUTL1 is a target of TGF- β signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 2005;7(6):521–32.
- Gregory P.A., Bracken C.P., Smith E. et al. An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2011;22(10):1686–98.
- Shibue T., Brooks M.W., Weinberg R.A. An integrin-linked machinery of cytoskeletal regulation that enables experimental tumor initiation and metastatic colonization. *Cancer Cell* 2013;24(4):481–98.
- Genschik P., Sumara I., Lechner E. The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. *EMBO J* 2013;32(17):2307–20.
- Linehan W.M., Lerman M.I., Zbar B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene. Its role in renal cancer. *JAMA* 1995;273:564–70.
- Chen H.Y., Chen R.H. Cullin 3 ubiquitin ligases in cancer biology: functions and therapeutic implications. *Front Oncol* 2016;6:113.
- Laudet V., Hänni C., Stéhelin D. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 1999;18(6):1351–9.
- Sementchenko V.I., Watson D.K. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 2000;19(55):6533–48.
- Fujimoto J., Aoki I., Toyoki H. et al. Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in metastatic lesions of ovarian cancers. *Oncology* 2004;66(5):420–8.
- Yamaguchi E., Nakayama T., Nanashima A. et al. Ets-1 proto-oncogene as a potential predictor for poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med* 2007;213(1):41–50.
- Rothhammer T., Hahne J.C., Florin C. et al. The Ets-1 transcription factor is involved in the development and

- invasion of malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(1):118–28.
36. Nakayama T., Ito M., Ohtsuru A. et al. Expression of the Ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14(5):415–22.
 37. Span P.N., Manders P., Heuvel J.J. et al. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 2002;21(55):8506–9.
 38. Puzovic V., Brcic I., Ranogajec I., Jakic-Razumovic J. Prognostic values of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expression and co-expression in breast cancer patients. *Neoplasma* 2014;61(4):439–46.
 39. Hahne J.C., Okuducu A.F., Kaminski A. et al. Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchoragein-dependent growth. *Oncogene* 2005;24(34):5384–8.
 40. Stamatkin C., Ratermann K.L., Overley C.W. et al. Inhibition of class IA PI3K enzymes in non-small cell lung cancer cells uncovers functional compensation among isoforms. *Cancer Biol Ther* 2015;16(9):1341–52.
 41. Sui X., Zhu J., Zhou J. et al. Epigenetic modifications as regulatory elements of autophagy in cancer. *Cancer Lett* 2015;360(2):106–13.
 42. Rodrigues M.F., Carvalho É., Pezzuto P. et al. Reciprocal modulation of histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and trichostatin a on the energy metabolism of breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2015;116(5):797–808.
 43. Song J., Noh J.H., Lee J.H. et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS* 2005;113(4):264–8.
 44. Brock M.V., Hooker C.M., Ota-Machida E. et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* 2008;358(11):1118–28.
 45. Sterlacci W., Tzankov A., Veits L. et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol* 2011;6(10):1649–57.
 46. Ibanez de Caceres I., Cortes-Sempere M., Moratilla C. et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2010;29(11):1681–90.
 47. Kaimori A., Potter J.J., Choti M. et al. Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. *Hepatology* 2010;52(3):1033–45.
 48. Chung C.L., Sheu J.R., Chen W.L. et al. Histone deacetylase inhibitor mcarboxycinnamic acid bis-hydroxamide attenuates plasminogen activator inhibitor-1 expression in human pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46(4):437–45.
 49. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
 50. Ortega S., Malumbres M., Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602(1):73–87.
 51. Choi Y.J., Li X., Hydbring P. et al. The requirement for cyclin d function in tumor maintenance. *Cancer Cell* 2012;22(4):438–51.
 52. Schutte M., Hruban R.H., Hedrick L. et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996;56(11):2527–30.
 53. Aso T., Lane W.S., Conaway J.W., Conaway R.C. Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 1995;269(5229):1439–43.
 54. Cockman M.E., Masson N., Mole D.R. et al. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel–Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275(33):25733–41.
 55. Jalava S.E., Porkka K.P., Rauhala H.E. et al. TCEB1 promotes invasion of prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2009;124(1):95–102.
 56. Zhao X., Chen M., Tan J. Knockdown of ZFR suppresses cell proliferation and invasion of human pancreatic cancer. *Biol Res* 2016;49(1):26.
 57. Lim Y.S., Tang B.L. The Evi5 family in cellular physiology and pathology. *FEBS Lett.* 2013; 587(12):1703–10.

Роль ингибирования аутофагии в изменении цитотоксичности темозоломида на клеточных линиях меланомы

О.О. Рябая^{1,2}, А.Н. Иншаков¹, А.А. Малышева¹, И.С. Абрамов^{1,3},
Н.В. Шолина¹, Д.А. Хоченков¹, Е.В. Степанова¹

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

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Оксана Олеговна Рябая oxa2601@yandex.ru

Введение. Несмотря на современные успехи в терапии метастатической меланомы кожи, эта нозология остается крайне резистентной к существующим препаратам. Современные данные свидетельствуют о том, что опухоли могут преодолевать гибель посредством аутофагии – процесса, при котором опухолевые клетки переваривают свои собственные белки и клеточные компоненты при недостатке энергии и дефиците питательных веществ.

Цель работы – исследование влияния ингибиторов аутофагии, таких как хлорокин (CQ) и LY-294.002 (LY) на цитотоксичность темозоломида (TMZ) в клеточных линиях меланомы человека.

Материалы и методы. Работа проведена на клеточных линиях меланомы Mel Z, Mel IL и Mel MTP, полученных от пациентов, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Оценку антипролиферативной активности TMZ в комбинации с ингибиторами аутофагии исследовали с помощью МТТ-теста и метода колониеобразования. Мы оценили изменение клеточного цикла, активацию апоптоза и изменение экспрессии основных маркеров аутофагии при комбинированной терапии.

Результаты. CQ и LY усиливали цитотоксичность TMZ и снижали число жизнеспособных колоний во всех изученных линиях, при этом оба ингибитора увеличивали накопление популяции клеток в стадии G0/G1 в линиях Mel Z, Mel IL, но не в Mel MTP. Показано также, что CQ и LY синергично активировали апоптоз во всех исследованных линиях. Анализ экспрессии матричной РНК ключевых генов аутофагии свидетельствовал о вовлечении данного процесса в цитотоксичность.

Заключение. Инактивация аутофагии на разных этапах данного процесса позволяет преодолевать резистентность к TMZ и может быть рассмотрена как перспективная мишень для терапии меланомы.

Ключевые слова: меланома, аутофагия, апоптоз, химиорезистентность, темозоломид, хлорокин, LY-294.002

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-75-82

The role of autophagy inhibition in the enhanced cytotoxicity of temozolomide on melanoma cell lines

O.O. Ryabaya^{1,2}, A.N. Inshakov¹, A.A. Malysheva¹, I.S. Abramov^{1,3}, N.V. Sholina¹, D.A. Khochenkov¹, E.V. Stepanova¹

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

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

³V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia

Background. Despite advantages in treatment of metastatic melanoma it remains resistant to current therapy. Recent evidence indicates that tumor cells could overcome death through autophagy, a process that degrades cellular proteins and organelles to maintain cellular biosynthesis during nutrient deprivation or lack of energy.

Objective: to investigate the involvement of autophagy inhibitors chloroquine (CQ) and LY-294.002 (LY) in temozolomide (TMZ) cytotoxicity in human melanoma cell lines.

Materials and methods. The study was performed on patient-derived melanoma cell lines Mel Z, Mel IL and Mel MTP. The anti-proliferative activity of combined TMZ and autophagy inhibitors treatment was determined by MTT assay and colony-forming assay. Cell cycle analysis, apoptosis activation and expression analysis of key autophagy markers under combined treatment was evaluated.

Results. CQ and LY enhanced the cytotoxicity of TMZ and reduced colony formation in 3 melanoma cell lines, moreover both inhibitors increased cell population in G0/G1 phase of cell cycle in Mel Z, Mel IL cell lines, but not in Mel MTP. CQ and LY synergistically activated apoptosis in all cell lines. The matrix RNA expression analysis of key autophagy genes showed autophagy involvement in enhanced cytotoxicity.

Conclusions. Thus, autophagy inhibition on different stages of this process could overcome resistance to TMZ and be applicable as potent target in metastatic melanoma treatment.

Key words: melanoma, autophagy, apoptosis, chemoresistance, temozolomide, chloroquine, LY-294.002

Введение

Метастатическая меланома — один из наиболее агрессивных типов опухолей с плохим прогнозом течения болезни, что связано с ее высоким метастатическим потенциалом, поздней диагностикой и резистентностью к химиотерапии на поздних стадиях [1, 2].

Стандартные режимы химиотерапии включают дакарбазин, темозоломид (TMZ), цисплатин и таксаны (паклитаксел, докситаксел), которые используют по отдельности или в комбинации без значительного улучшения выживаемости больных — только 10–20 % пациентов отвечают на терапию, а медиана выживаемости составляет всего 6–8 мес [3, 4]. Таким образом, поиск новых лекарственных препаратов и вариантов их комбинаций на сегодняшний день является одним из актуальных вопросов химиотерапии злокачественных опухолей.

TMZ — липофильная молекула алкилирующего агента — производного тетразина [5]. Цитотоксичность TMZ обусловлена образованием O⁶-метилгуанина в ДНК, который замещается тиминном во время репликации, вызывая ошибки в репарации, и последующим повреждением ДНК [6]. При лечении TMZ арест клеточного цикла происходит в фазе G₂–M, но при этом лишь небольшое число клеток подвергается апоптозу [7, 8]. Несмотря на невысокую частоту ответных реакций, достоинством TMZ является легкость введения, хорошая переносимость и способность проникать через гематоэнцефалический барьер, что обеспечивает умеренную противоопухолевую активность в отношении метастазов в головной мозг [9].

Один из процессов, индуцируемых в клетках меланомы в ответ на химиотерапию, — аутофагия [1], основная функция которой заключается в поддержании межклеточного гомеостаза путем переваривания секвестрированных белков и органелл через лизосомальный путь деградации [10].

При метастатической меланоме аутофагия рассматривается как адаптивный механизм для преодоления неблагоприятных условий и недостатка питательных веществ [11, 12], поддерживая уровень аденозинтрифосфата, что приводит к росту опухоли и лекарственной устойчивости. В большинстве случаев опухоль имеет более высокий уровень аутофагии по сравнению с нормальными тканями, что коррелирует с повышенной выживаемостью опухолевых клеток и, как следствие, плохим исходом заболевания [12, 13]. Поскольку вызванная противоопухолевой терапией аутофагия способствует резистентности к ряду препаратов, особенно тех, которые нацелены на сигнальный путь PI3K/mTOR, ингибирование аутофагии может помочь

преодолеть химиорезистентность меланомы к стандартной терапии. В последние годы несколько клинических испытаний, сочетающих противоопухолевые препараты с ингибиторами аутофагии при разных типах злокачественных образований, показали, что ингибирование аутофагии вызывает уменьшение роста опухоли и увеличивает выживаемость пациентов [14–16].

Показано, что алкилирующие химиотерапевтические препараты, такой как TMZ, индуцируют процесс аутофагии в опухолевых клетках, например при глиоме и меланоме кожи [17, 18]. В некоторых случаях аутофагия задерживает апоптоз в опухолевых клетках при лечении противоопухолевыми препаратами и использование ингибиторов аутофагии — хлорокина (CQ) или LY-294.002 (LY) — усиливает действие химиотерапевтических препаратов, вызывающих аддитивную или синергическую цитотоксичность и апоптоз [19, 20].

Одним из ингибиторов аутофагии является CQ — производное хинолина противомаларийный препарат. Опухолевые клетки содержат лизосомы, которые реагируют с CQ, образуя ионизированную CQ-конъюгированную кислоту. При достижении критической концентрации CQ внутри лизосомы он нарушает их ферментативную функцию, действуя как слабое основание, и ингибирует клиренс аутофаголизосомы [21]. В недавних исследованиях показано, что противоопухолевая комбинация CQ с TMZ приводила к индукции апоптоза в клеточных линиях глиомы с диким типом p53 [22].

Результаты исследования терапевтического агента LY на ранних стадиях показали, что он неактивен в качестве единственного агента, однако его комбинация с гефитинибом эффективно снижает жизнеспособность клеток меланомы по сравнению с монотерапией, а также в комбинации с TMZ в экспериментах с глобластомой U87 [23, 24].

Меланома кожи — гетерогенная опухоль, что связано с наличием различных генетических нарушений в зависимости от подтипов заболевания. Соответственно, опухоли с разными мутациями различно отвечают на одну и ту же терапию. Так, опухоли с мутациями в гене *BRAF*, которые встречаются в 50–70 % случаев меланомы [25], являются более резистентными к терапии и отличаются повышенным уровнем базальной аутофагии в опухоли [26, 27].

В настоящей работе мы оценивали эффективность ингибирования аутофагии при комбинированной терапии с TMZ на клеточных линиях меланомы с различным статусом гена *BRAF*. Также мы определяли эффективность комбинаций TMZ и CQ (ингибитор терминальной стадии процесса аутофагии) по сравне-

нию с комбинацией TMZ и LY (ингибитор PI3K). Наши данные показывают, что CQ и LY усиливают цитотоксичность TMZ и индуцируют арест клеточного цикла в фазе G0/G1. Хотя повышенная цитотоксичность не коррелировала с наличием онкогенных мутаций в гене *BRAF*, ингибирование аутофагии можно рассматривать как перспективный подход для повышения эффективности терапии TMZ.

Материалы и методы

Клеточные линии. Клетки метастатической меланомы Mel Z, Mel IL и Mel MTP были получены из опухолевого материала пациентов, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина [28]. Клеточные линии культивировали в RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС, NuClone, США), 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 10 МЕ/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при температуре 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Оценка цитотоксичности. Клеточные линии (8 × 10⁴ кл/лунка) вносили в 96-луночный планшет. Через 24 ч заменяли среду и добавляли CQ (20 мкМ) или LY (5 мкМ), инкубировали в течение 1 ч. Затем добавляли TMZ (100 мкМ) и далее инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °C с 5 % CO₂. Затем вносили раствор МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид, Sigma, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Образовавшиеся кристаллы диформаза элюировали с клеточных мембран ДМСО (200 мкл/лунка). Результат оценивали спектрофотометрически при длине волны 540 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали следующим образом:

$$(\text{OD экспериментальной группы} - \text{OD контрольной группы}) / \text{OD контрольной группы} \times 100 \%$$

Иммуноблоттинг. Клетки (2 × 10⁶) лизировали в буфере, содержащем 50 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, 0,5 % дезоксихолата натрия, 0,1 % SDS, 10 мкл/мл ингибирующего коктейля, 1 mM РМSE, 100 мкмоль/л ДТТ (pH 7,5) в течение 40 мин при +4 °C, центрифугировали при 13400 об/мин 15 мин при +4 °C. Концентрацию белка определяли с помощью набора Quant-IT Protein assay kit согласно протоколу производителя (Invitrogen, США) путем измерения оптической плотности на спектрофлуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Электрофорез образцов, содержащих по 40–60 мкг белка, проводили в 10 % SDS-полиакриламидном геле, белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio Rad, США) методом полусухого электропереноса в системе Trans-Blot Turbo (Bio Rad, США) при 1,3 A и 25 В в течение 7 мин. Для предотвращения неспецифической сорбции нитроцеллюлозную мембрану обрабатывали 5 % раствором сухого молока (Applichem,

Германия) в TBS-T. Мембрану инкубировали с первичными антителами LC3B (Novus Biologicals, Великобритания), p62/SQSTM1 (Cell Signaling, США) и β-актином (Sigma, США) в течение ночи при температуре +4 °C, отмывали раствором TBS-T при комнатной температуре, инкубировали 1,5 ч со вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными пероксидазой хрена (Amersham, США). Затем добавляли хемилюминесцентный субстрат Clarity ECL (Bio Rad, США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на ChemiDoc Touch (Bio Rad, США). Денситометрический анализ проводили с помощью программы Image J (NIH, США).

Определение колониеобразования. Клетки (200 тыс/лунка) высаживали в 6-луночные планшеты. К клеткам добавляли TMZ с CQ или LY и без них по описанной выше методике и инкубировали 24 ч. После этого клетки снимали, подсчитывали в камере Горяева и пересаживали на новые 6-луночные планшеты в количестве 2 тыс/лунка в триплетах и культивировали 12 дней, заменяя питательную среду каждые 3 дня. Затем колонии фиксировали в 1 % формалине, окрашивали 0,5 % раствором кристаллического фиолетового. Число колоний подсчитывали в программе Image J (NIH, США).

Цитометрическое определение апоптоза. Количество апоптотических клеток определяли окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия (PI) с использованием набора AnnexinV-FITC (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. После инкубации с препаратами их центрифугировали, осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS, добавляли раствор, содержащий PI и аннексин V. Клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, далее добавляли 350–400 мкл связывающего буфера для остановки реакции. Анализ данных (не менее 10 тыс. событий) проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II с использованием программного обеспечения WinMDI.

Анализ клеточного цикла. После инкубации с препаратами клетки промывали PBS, осадок ресуспендировали в 400 мкл буфера, содержащего 50 мкг/мл PI (Becton Dickinson, США) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Флуоресценцию PI измеряли на проточном цитометре FACSscan (FACS Canto II, BD). Распределение клеточного цикла анализировали с использованием программного обеспечения ModFit 3.2.

Анализ экспрессии генов. Выделение РНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией в реальном времени. Через 24 ч после культивирования с химиопрепаратами клетки лизировали реагентом TRIzol (Sigma, США), как описано в литературе [29]. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) брали 250 нг РНК и проводили обратную транскрипцию в конечном объеме смеси 20 мкл с использованием iScript™ Select cDNA Synthesis Kit согласно инструкции (Bio Rad, США). Реакцию проводили при температуре

42 °С в течение 70 мин. Фермент обратной транскриптазы (ревертазы) инактивировали нагреванием реакционной смеси до 85 °С в течение 5 мин. Контроль обратной транскрипции проводили при отсутствии обратной транскриптазы. В качестве матрицы для ПЦР была использована полученная кДНК. Изменение экспрессии матричной РНК (мРНК) SQSTM/p62, LC3B, Beclin 1 определяли путем нормализации образцов к референсным генам (β -актин и GAPDH). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на CFX96 Real-Time System (Bio Rad, США) с применением коммерческой смеси iTaq® Universal SYBR® Green Supermix согласно протоколу производителя (Bio Rad, США). ПЦР-смесь содержала 5 пмоль праймеров SQSTM/p62, LC3B, Beclin 1, GAPDH и β -актин и 2 мкл (50 нг) кДНК. Были использованы следующие праймеры: GAPDH: 5'-GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT-3', 5'-GACGCCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (212 пар оснований (п.о.)); β -актин: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3' (201 п.о.); Beclin 1: 5'-GAGTTTCAAGATCCTGGACCGTGTC-3' (282 п.о.), 5'-CTGTTGGCACTTCTGTGGACATCA-3'; LC3B: 5'-GCCGCCGCCAGATCCCT-3', 5'-GACGCTGACCATGCTGTGTCG-3' (140 п.о.); SQSTM/p62: 5'-GGCCGCCCTGTTCCTCCG-3', 5'-GCCGGCACTCTTTTCTCTT-3' (167 п.о.). Условия амплификации: инициация 5 мин при температуре 95 °С, затем 39 циклов: 5 с – 95 °С, 30 с – 60 °С и 30 с – 72 °С. После 39-го цикла проводили анализ кривых плавления путем детекции флуоресценции при постепенном нагревании образцов до 95 °С с шагом 0,5 °С/с. Все образцы анализировали в дупле в 96-луночных низкопрофильных планшетах или стрипах. Результаты количественной ПЦР с обратной транскрипцией представлены параметром $\Delta\Delta C_t$.

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в 3 повторах. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel, а графический интерфейс составлен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.5.0. (GraphPad, США). Для достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически достоверным.

Результаты и обсуждение

Цитотоксичность комбинаций TMZ с ингибиторами аутофагии. Изучение действия TMZ в комбинации с ингибиторами аутофагии проводили на 3 клеточных линиях меланомы с разным молекулярно-генетическим статусом гена *BRAF*, который был определен нами ранее [30]: Mel Z (V600E), Mel IL (V600K), Mel MTP – дикий тип. Мы определили величину концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) TMZ у всех клеточных линий, которая составила 150 ± 10 мкМ ($p < 0,05$) для линий Mel Z, Mel MTP и 200 ± 13 мкМ ($p < 0,05$) для линии Mel IL. Для дальнейших исследований использовали TMZ в нетоксической

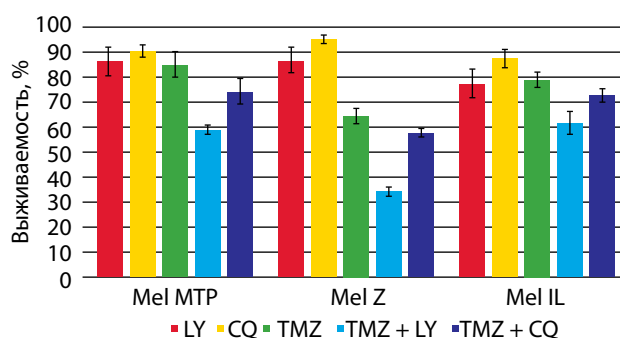


Рис. 1. Ингибирование аутофагии 20 мкМ хлорокина (CQ) или 5 мкМ LY-294.002 (LY) увеличивает цитотоксичность 100 мкМ темозоломида (TMZ) на клеточных линиях меланомы Mel Z, Mel IL и Mel MTP ($p < 0,05$)

концентрации 100 мкМ. Чтобы исключить отдельное влияние токсичности ингибиторов, в эксперимент также были взяты нетоксичные дозы CQ (20 мкМ) и LY (5 мкМ), которые значимо не влияли на клеточную пролиферацию.

Влияние ингибиторов аутофагии на цитотоксичность TMZ исследовали при предварительной инкубации клеток в течение 1 ч с 20 мкМ CQ и 5 мкМ LY, после чего добавляли 100 мкМ TMZ. Все комбинации демонстрировали усиленный антипролиферативный эффект по сравнению с монотерапией TMZ (рис. 1). Использование комбинации 20 мкМ CQ и 100 мкМ TMZ приводило к 10–15 % ингибированию роста для всех клеточных линий, комбинации 100 мкМ TMZ и 5 мкМ LY – к 30 % увеличению гибели клеток Mel Z, Mel MTP и 15 % увеличению гибели Mel IL. При этом цитотоксичность комбинаций не зависела от мутаций в гене *BRAF*.

Чтобы определить роль аутофагии в цитотоксическом эффекте TMZ, меланомные клетки культивировали в присутствии TMZ с CQ или LY и без них в течение 24 ч в ряде экспериментов на колониеобразование. Применение TMZ в монорежиме не влияло на жизнеспособность клеток Mel IL – имело место незначительное увеличение числа колоний. Комбинация TMZ + LY снижала на 10 % количество колоний относительно контроля, а TMZ + CQ – на 25 % ($p = 0,05$). Число колоний MEL Z уменьшалось на 30 % при применении TMZ, добавление LY не оказывало действия на жизнеспособность клеток. Комбинация TMZ + CQ снижала количество колоний на ~60 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 2). Следует отметить, что под действием как TMZ, так и его комбинаций с CQ/LY клетки линии Mel MTP не образовывали жизнеспособных колоний (данные не представлены).

Влияние ингибиторов аутофагии на клеточный цикл клеточных линий меланомы. CQ блокирует аутофагию, повышая уровень внутрилизосомного pH и тем самым нарушая функцию лизосомальных гидролаз [31]. LY является ингибитором PI3K, участвующим в инициации процесса аутофагии [24, 32]. Мы наблюдали,

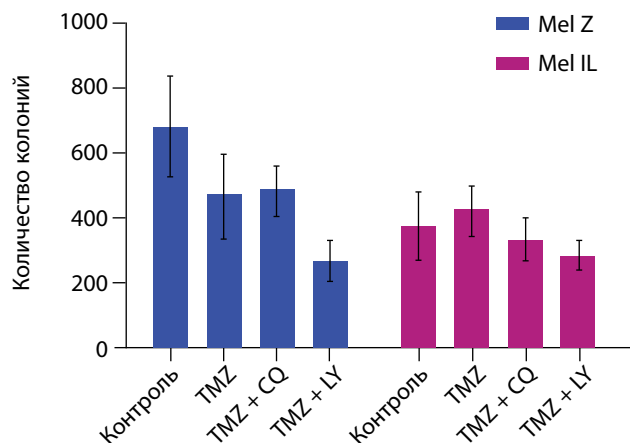


Рис. 2. Колониеобразование под действием темозоломида (TMZ) и его комбинации с хлорокином (CQ) или LY-294.002 (LY)

что при TMZ-терапии происходит арест клеточного цикла в фазе G0/G1 в 3 исследуемых линиях. Обработка клеток TMZ и CQ увеличивала популяцию клеток в фазе G0/G1 на клеточных линиях с мутацией V600 – Mel Z (54,9 % (TMZ) против 71,4 % (TMZ + CQ)) и Mel IL (56,4 % (TMZ) против 78,8 % (TMZ + CQ)), но никаких изменений в WT Mel MTP не наблюдалось. Комбинация TMZ и LY приводила к более значительному

накоплению клеток в фазе G0/G1 по сравнению с монотерапией TMZ в клеточных линиях Mel Z (54,9 % против 74,0 %) и Mel IL (56,40 % против 85,23 %) в отличие от комбинации TMZ и CQ. TMZ с CQ или LY не влиял на клеточный цикл Mel MTP (рис. 3). Сами ингибиторы также не изменяли распределение клеток по циклу (данные не представлены). Недавно S.W. Lee и соавт. продемонстрировали, что комбинированное лечение TMZ с CQ не меняло фазу ареста G2–M, но увеличивало популяцию суб-G1 в клетках глиобластомы U87 [22].

Активация апоптоза под действием комбинации TMZ с ингибиторами аутофагии. Для изучения влияния комбинации препаратов на апоптотическую гибель клеток мы окрашивали клеточные линии с помощью аннексина V/PI и анализировали цитометрически. Уровень апоптотических клеток в случае применения монотерапии варьировал: TMZ индуцировал апоптоз в 24,0 % клеток линии Mel MTP, в 12,6 % – Mel Z и в 9,0 % – Mel IL. Комбинированное лечение с CQ повышало на 15–20 % количество апоптотических клеток Mel Z, Mel IL и Mel MTP. Предварительная обработка LY менее значимо увеличивала гибель клеток путем апоптоза в линиях Mel Z и Mel IL. Клетки линии Mel MTP были

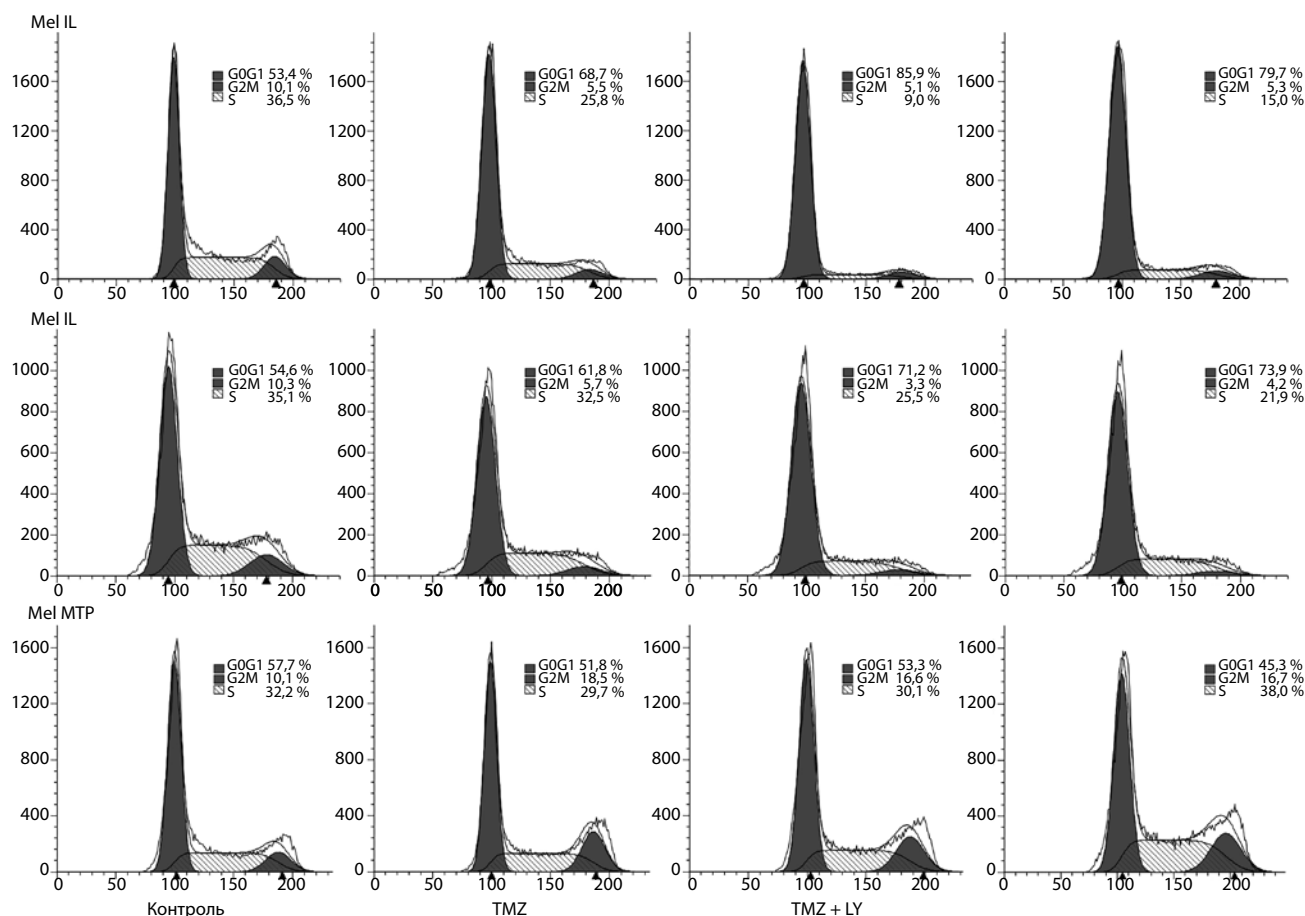


Рис. 3. Влияние 100 мкМ темозоломида (TMZ) и его комбинаций с 20 мкМ хлорокина (CQ) или 5 мкМ LY-294.002 (LY) на распределение клеток линий Mel Z, Mel IL и Mel MTP по фазам клеточного цикла (CV 5 %)

Апоптотическая активность TMZ и/или ингибиторов аутофагии на клеточных линиях меланомы. Окраска аннексином V/PI после 24-часовой инкубации с препаратами ($CV < 5\%$; $p < 0,05$)

Вид терапии	Уровень апоптоза, %		
	Mel Z	Mel IL	Mel MTP
TMZ	12,6	9,0	24,0
CQ	8,3	5,3	15,5
LY	4,5	1,5	14,5
TMZ + CQ	27,6	28,3	39,5
TMZ + LY	20,1	14,2	39,3

Примечание. TMZ – темозоломид; CQ – хлорокин; LY – LY-294.002.

чувствительны к комбинации TMZ и LY (24,0 % против 39,3 %; $p < 0,05$) (см. таблицу).

Таким образом, TMZ-индуцированная аутофагия защищает меланомные клетки от запуска апоптоза и инактивация аутофагии впоследствии увеличивает гибель клеток при использовании TMZ. Комбинированный эффект TMZ и CQ опосредуется увеличением апоптоза в клетках меланомы, однако активация апоптоза не зависит от мутаций в гене *BRAF*.

Мы изучили влияние комбинированной терапии TMZ и CQ или LY на активацию аутофагии в клеточных линиях меланомы по уровню экспрессии мРНК *Beclin 1*, *LC3B* и *p62*. TMZ является индуктором аутофагии [24], что было подтверждено увеличением уровня относительной экспрессии мРНК *Beclin 1* в клетках меланомы, а добавление ингибиторов аутофагии, напротив, уменьшало уровень *Beclin 1*. Течение процесса аутофагии в клетках можно изучать путем соотношения уровня мРНК *LC3B*/II и *p62/SQSTM1* [33]. Последнее связывает убиквитинированные белки и доставляет их в аутофагосомы для расщепления. При контакте с аутофагосомой *p62* связывается с *LC3B*II и сам впоследствии расщепляется в аутолизосоме, поэтому его уровень может отражать уровень аутофагии: при повышении уровня *LC3B*/II снижается содержание *p62/SQSTM1* в клетках [34, 35]. Мы продемонстрировали, что под действием TMZ уровень экспрессии мРНК *LC3B*/II был увеличен в клеточных линиях Mel Z и Mel IL, но не в Mel MTP, а транскрипционная активность *p62/SQSTM1* была снижена (рис. 4). При добавлении CQ или LY отмечали повышение уровня транскрипционной активности *p62/SQSTM1* одновременно со снижением экспрессии *LC3B*/II, что доказывает подавление аутофагии в клетках.

Оценивая переход *LC3*-I в *LC3*-II методом иммуноблоттинга (рис. 5), мы показали, что монотерапия TMZ приводила к накоплению *LC3B*/II в 3 исследуемых кле-

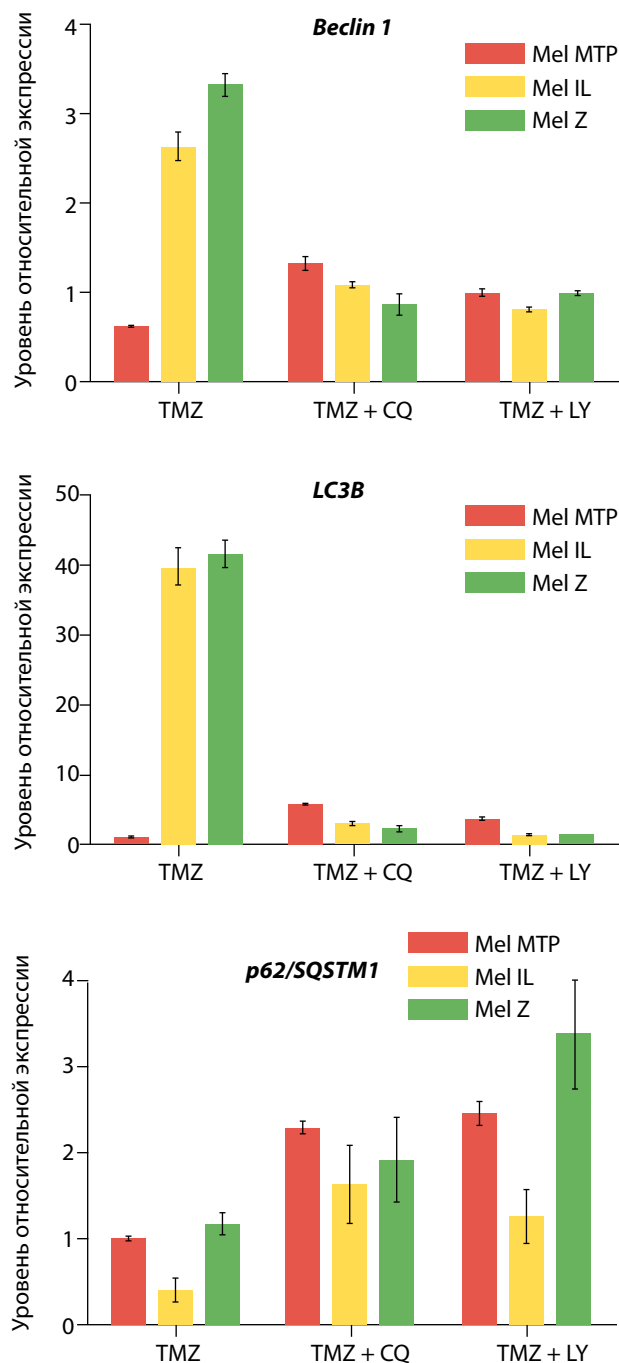


Рис. 4. Изменение экспрессии матричной РНК генов *Beclin 1*, *LC3B* и *p62/SQSTM1* после 24-часовой культивации с 100 мкМ темозоломида (TMZ) с 20 мкМ хлорокина (CQ) или 5 мкМ LY-294.002 (LY) и без них

точных линиях, а его комбинация с CQ увеличивала экспрессию белка *LC3B*/II, блокируя расщепление аутолизосом. Добавление LY к TMZ не показывало аналогичных результатов на уровень *LC3B*/II в клетках. При этом экспрессия *p62/SQSTM1* при комбинированной терапии TMZ и CQ повышалась только у линий Mel IL и Mel MTP.

Несмотря на то, что *p62/SQSTM1* вовлечен в процесс аутофагии в качестве «транспортировщи-

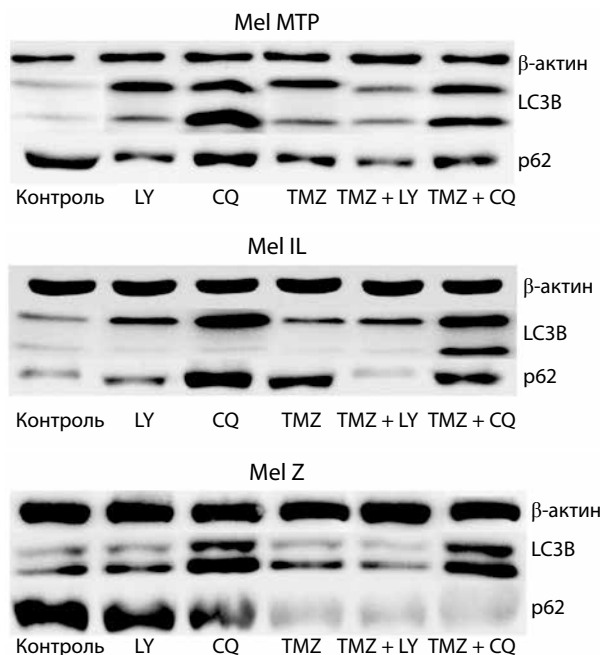


Рис. 5. Иммуноблоттинг экспрессии LC3B и p62 после комбинированной терапии темозоломида (TMZ) и хлорокина (CQ) или LY-294.002 (LY) на клеточных линиях меланомы

ка» материала для расщепления, его функции в клетке на этом не ограничиваются [36]. Повышенный уровень p62 по принципу положительной обратной связи ведет к увеличению количества активных форм кислорода в клетке, усиленной индукции фолдинга белков в ответ на ЭР-стресс и ДНК-повреждения [36].

Заключение

Таким образом, комбинированная терапия при низких концентрациях может эффективно подавлять рост клеток меланомы. Мы показали, что CQ и LY снижают TMZ-индуцированную аутофагию, тем самым усиливая ингибирующее действие на клеточные линии меланомы. TMZ в сочетании с CQ или LY синергически ингибирует рост за счет увеличения ареста клеточного цикла в фракции G0/G1 в клетках Mel Z и Mel IL, несущих мутацию *BRAF*, но не в Mel MTP. Однако взаимодействие между аутофагией и мутациями *BRAF* пока остается неясным. Наше исследование свидетельствует о том, что комбинация TMZ и исследуемых ингибиторов может увеличивать противоопухолевую активность по сравнению с монотерапией TMZ при лечении злокачественной меланомы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-35-00 107-П).

Financing. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 14-35-00 107-П).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Saito R.F., Tortelli T.C. Jr, Jacomassi M.D. et al. Emerging targets for combination therapy in melanomas. *FEBS Lett* 2015;589(22):3438–48.
- Soura E., Eliades P.J., Shannon K. et al. Hereditary melanoma: update on syndromes and management: emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. *J Am Acad Dermatol* 2016;74(3):411–20.
- Luke J., Schwartz G. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin in Dermat* 2013;31(3):290–7.
- Yeramian A., Sorolla A., Velasco A. et al. Inhibition of activated tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway. *Int J Cancer* 2012;130:967–78.
- Zhang J., Stevens M.F., Bradshaw T.D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012;5(1):102–14.
- Denny B.J., Wheelhouse R.T., Stevens M.F. et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 1994;33(31):9045–51.
- Hirose Y., Berger M.S., Pieper R.O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2001;61(5):1957–63.
- Kanzawa T., Germano I.M., Komata T. et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004;1(4):448–57.
- Rangwala R., Leone R., Chang Y.C. et al. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014;10(8):1369–79.
- Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(12):961–7.
- Maes H., Martin S., Verfaillie T., Agostinis P. Dynamic interplay between autophagic flux and Akt during melanoma progression in vitro. *Exp Dermatol* 2014;23(2):101–6.
- Lazova R., Camp R.L., Klump V. et al. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin Cancer Res* 2012;18(2):370–79.
- Guo J.Y., Chen H.Y., Mathew R. et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011;25(5):460–70.
- Thorburn A., Morgan M.J. Targeting autophagy in BRAF mutant tumors. *Cancer Discov* 2015;5(4):353–4.
- National Library of Medicine US. Clinical trials investigating the use of chloroquine in cancer: NCT01575782, NCT00969306, NCT01446016, NCT01023477, NCT01469455, NCT01438177, NCT01727531, NCT00224978. Clinicaltrials.gov: Bethesda, MD, 2013.

16. National Library of Medicine US. Clinical trials investigating the use of hydroxychloroquine in cancer: NCT01273805, NCT00933803, NCT01006369, NCT01480154, NCT00765765, NCT00728845, NCT01266057, NCT00813423, NCT01494155, NCT01023737, NCT00786682, NCT00726596, NCT01417403, NCT00809237, NCT00909831, NCT00714181, NCT00714181, NCT01206530, NCT01026844, NCT00486603, NCT01649947, NCT00977470, NCT01506973, NCT01128296, NCT00568880, NCT01144169, NCT00962845, NCT01292408, NCT01689987, NCT01550367, NCT01396200, NCT01227135, NCT01602588, NCT01510119, NCT00031824, NCT01548768, NCT00908089, NCT01687179, NCT00405275, NCT00771056, NCT01709578. Clinicaltrials.gov: Bethesda, MD, 2013.
17. Katayama M., Kawaguchi T., Berger M.S., Pieper R.O. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2007;14(3):548–58.
18. Ma X.H., Piao S., Wang D. et al. Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(10):3478–89.
19. Amaravadi R.K., Yu D., Lum J.J. et al., Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;117(2):326–36.
20. Guo X.L., Li D., Hu F. et al. Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2012;320(2):171–9.
21. Carew J.S., Nawrocki S.T., Cleveland J.L. Modulating autophagy for therapeutic benefit. *Autophagy* 2007;3(5):464–7.
22. Lee S.W., Kim H.K., Lee N.H. et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Lett* 2015;360(2):195–204.
23. Carlino M.S., Todd J.R., Gowrishankar K. et al. Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. *Mol Oncol* 2014;8(3):544–54.
24. Yang Y.P., Hu L.F., Zheng H.F. et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34(5):625–35.
25. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54.
26. Armstrong J.L., Corazzari M., Martin S. et al. Oncogenic B-RAF signaling in melanoma impairs the therapeutic advantage of autophagy inhibition. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2216–26.
27. Ma X.H., Piao S.F., Dey S. et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014;124(3):1406–17.
28. Mikhaylova I.N., Kovalevsky D.A., Morozova L.F. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2008;18(5):303–13.
29. Miracco C., De Nisi M.C., Arcuri F. et al. Macrophage migration inhibitory factor protein and mRNA expression in cutaneous melanocytic tumours. *Int J Oncol* 2006;28(2):345–52.
30. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.А. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена *B-RAF* на способность клеток меланомы к аутофагии. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2013;(3):68–72. [Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A. et al. Effect of Activating V600 mutations of the *B-RAF* gene on the ability of melanoma cells to autophagy. *Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi* = *Sarkomas of Bones, Soft Tissues and Skin Tumors* 2013;(3):68–72. (In Russ.)].
31. Kimura T., Takabatake Y., Takahashi A., Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 2013;73(1):3–7.
32. Diez H., Benitez M.J., Fernandez S. et al. Class I PI3-kinase or Akt inhibition do not impair axonal polarization, but slow down axonal elongation. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(11):2574–83.
33. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edn). *Autophagy* 2016;12(1):1–222.
34. Mathew R., Karp C.M., Beaudoin B. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137(6):1062–75.
35. Pankiv S., Clausen T.H., Lamark T. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007;282(33):24131–45.
36. Amaravadi R., Kimmelman A.C., White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2016;30(17):1913–30.

Влияние нарушенной экспрессии HNF4 α на чувствительность клеток гепатоцеллюлярной карциномы к действию ингибиторов проопухолевых сигнальных каскадов

А.С. Макарова¹, О.М. Кривцова^{1,2}, М.С. Чесноков¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Наталия Леонидовна Лазаревич lazarevich.nl@gmail.com

Введение. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) характеризуется агрессивным течением, высокой частотой случаев летальности и устойчивостью к существующим схемам терапии. Исследование ассоциированных с патогенезом ГК молекулярных нарушений, которые влияют на биологические свойства клеток ГК, позволяет оценить потенциальную эффективность ингибирования конкретных проопухолевых сигнальных каскадов. Настоящая работа посвящена изучению действия снижения экспрессии ключевого регулятора гепатоцитарной дифференцировки HNF4 α , которое часто происходит в ГК, на чувствительность клеток культур ГК к ингибиторам важных проопухолевых сигнальных путей mTOR, CDK4/6-pRb и ROCK.

Материалы и методы. В культурах ГК человека HepG2 и Huh7 со стабильным нокаутом гена HNF4A определяли изменение пролиферативного и миграционного потенциалов клеток, а также изменение данных свойств при действии ингибиторов mTOR (рапамицина), CDK4/6 (PD0332991, палбоциклиба) и ROCK 1/2 (Y27632). Уровни экспрессии генов определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Нокаут гена HNF4A вызывает изменение миграционной способности клеток HepG2 и Huh7, ассоциированное с изменением экспрессии E-кадгерина и N-кадгерина. Снижение экспрессии HNF4 α ослабляет опосредованное Y27632-подавление миграционного потенциала в клетках ГК. Нокаут гена HNF4A приводит к возникновению устойчивости клеток Huh7 и увеличению чувствительности клеток HepG2 к действию рапамицина и PD0332991, блокирующих миграционную способность клеток.

Заключение. Уровень экспрессии HNF4 α влияет на миграционную способность клеток ГК и их чувствительность к действию ингибиторов mTOR, CDK4/6 и ROCK1/2 на миграционную активность.

Ключевые слова: HNF4 α , гепатоцеллюлярная карцинома, определение действия противоопухолевых ингибиторов, рапамицин, палбоциклиб, Y27632

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-83-91

Impact of HNF4 α disrupted expression on hepatocellular carcinoma cells sensitivity to oncogenic pathways inhibitors

A.S. Makarova¹, O.M. Krivtsova^{1,2}, M.S. Chesnokov¹, N.L. Lazarevich^{1,2}

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

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Introduction. Hepatocellular carcinoma (HCC) is characterized by aggressive course, high lethality rate and resistance to current systemic treatment. Analysis of molecular aberrations associated with HCC pathogenesis that control biological properties of HCC allows to evaluate potential efficacy of inhibiting certain oncogenic cascades. The present study is focused on investigation of the impact of reduced expression of the key hepatocyte differentiation regulator, HNF4 α , often downregulated in HCC, that influences sensitivity of HCC cells to inhibitors of the major oncogenic pathways mTOR, CDK4/6-pRb and ROCK.

Materials and methods. Changes in cells proliferation and migration caused by HNF4A gene stable knockdown were tested in human HCC cell cultures HepG2 and Huh7 followed by examination of these cellular properties under mTOR (rapamycin), CDK4/6 (PD0332991, palbociclib) and ROCK 1/2 (Y27632) inhibitors treatment. Gene expression levels were estimated by the real-time polymerase chain reaction method (Real-Time PCR).

Results. HNF4A gene knockdown alters HepG2 and Huh7 cell migration associated with E-cadherin and N-cadherin expression changes. The HNF4 α repression weakens Y27632-induced blockade of HCC cells migration potential. HNF4A gene knockdown causes resistance of Huh7 cells and increase of HepG2 cells sensitivity to rapamycin and PD0332991 that block cells migration ability.

Conclusions. Expression level of HNF4 α renders influence on migration of HCC cells and contributes to their sensitivity to mTOR, CDK4/6 and ROCK1/2 inhibitors' impact on cell migration activity.

Key words: HNF4 α , hepatocellular carcinoma, cancer drug tests, rapamycin, palbociclib, Y27632

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения на 2015 г., опухоли печени занимают 2-е место по уровню смертности среди онкологических заболеваний [1]. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — самый распространенный тип рака печени, который диагностируют в основном на поздних стадиях. Для ГК характерно агрессивное течение, обуславливающее крайне неблагоприятный прогноз. Высокая генетическая гетерогенность ГК определяет низкую чувствительность к стандартной химиотерапии и невысокую эффективность таргетных препаратов [2].

При гепатоканцерогенезе, как и при других злокачественных процессах, нарушается дифференцировка клеток, ускоряется их пролиферация, и трансформированные клетки приобретают способность к метастазированию [3, 4]. Регуляция этих событий, формирующих злокачественный фенотип опухоли, осуществляется на разных уровнях.

Система гепатоцитарных транскрипционных факторов, в которой ключевую роль играет гепатоцитарный ядерный фактор альфа (HNF4 α), осуществляет тканеспецифическую регуляцию дифференцировки, морфогенеза и пролиферации гепатоцитов [4]. Транскрипция гена *HNF4A* с 2 альтернативно регулируемых промоторов обуславливает генерацию групп изоформ HNF4 α P1 и HNF4 α P2 [5, 6]. Прогрессия ГК ассоциировано с подавлением экспрессии HNF4 α P1, которое вызывает дедифференцировку клеток и нарушение эпителиальной морфологии [4]. При развитии ГК индуцируется экспрессия эмбриоспецифичных изоформ HNF4 α P2 [7]. На поздних этапах опухолевой прогрессии может происходить репрессия обеих групп изоформ [8]. На модельных системах ГК показано, что HNF4 α выполняет функцию опухолевого супрессора, а его экзогенная экспрессия в клетках ГК способствует снижению их пролиферативной активности и уменьшению метастатического потенциала [8–10]. Временный нокдаун *HNF4A* в клетках культур ГК повышает их пролиферативный потенциал и способность к инвазии [11].

Прогрессия ГК сопровождается активацией проопухолевых сигнальных путей Wnt/ β -катенин, PI3K/AKT/mTOR и нарушением контроля клеточного цикла вследствие инактивации его негативных регуляторов — p53, pRb и p21^{WAF1/CIP1} [2, 3]. При гепатоканцерогенезе приобретение трансформированными клетками подвижности и способности к метастазированию происходит вследствие активации сигнальных путей с участием малых ГТФаз: Rac1, RhoA/ROCK и Cdc42 [12].

Происходящее при прогрессии ГК нарушение перечисленных регуляторных систем определяет изменение биологических свойств опухолевых клеток, однако совместное влияние репрессии HNF4 α и активации онкогенных каскадов на свойства клеток ГК не изучено. Стабильное подавление экспрессии HNF4 α

в дифференцированных культурах ГК может быть моделью этапа прогрессии ГК, ассоциированного с нарушением опухолесупрессорной функции HNF4 α . Мы провели исследование влияния нокдауна гена *HNF4A* на биологические свойства культур ГК и оценили в данной системе эффекты ингибирования проопухолевых сигнальных каскадов на ключевые свойства клеток, формирующие опухолевый фенотип.

Материалы и методы

Культивирование клеточных линий. В работе использовали культуры ГК человека HepG2 (получена из американской коллекции клеточных культур) и Huh7 (получена из Европейского банка клеточных культур). Клетки HepG2 культивировали в среде игла (Invitrogen, США), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), заменимые аминокислоты (Invitrogen, США), 110 мг/л пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 300 мг/л глутамин (ПанЭко, Россия) и смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки Huh7 культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, глутамин и антибиотиков в дозах, указанных выше. Клетки культивировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Каждые 2–3 дня клетки обрабатывали 0,25 % раствором трипсина и пересевали. Для проведения функциональных тестов количество клеток в суспензии подсчитывали с помощью автоматического счетчика Bio Rad TC10 (Bio Rad Laboratories, США) в присутствии трипанового синего.

Для обработки клеток применяли ингибиторы: рапамицин (Calbiochem, США), PD0332991 (Sellekchem, США), Y27632 (Calbiochem, США), растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для выбора оптимальных концентраций ингибиторов использовали МТТ-тест по протоколу, описанному ранее [13]. Клетки культур ГК, посеянные в количестве 16 тыс./лунка 96-луночного планшета, каждые сутки обрабатывали ингибиторами или ДМСО в течение 48 ч, затем инкубировали клетки с МТТ в течение 3 ч и измеряли оптическую плотность полученных растворов формазана с помощью планшетного считывателя SpectraMax M5e (Molecular Devices, США) при длине волны 570 нм. Для всех концентраций ингибиторов рассчитывали долю жизнеспособных клеток относительно контроля, обработанного ДМСО. На основании кривых «доза–эффект» и с учетом данных литературы об используемых концентрациях и действии изучаемых ингибиторов были выбраны эффективные концентрации, которые составили 100 нм, 1 мкМ и 10 мкМ для рапамицина, PD0332991 и Y27632 соответственно.

При изучении действия ингибиторов на клетки культур ГК с подавленной экспрессией HNF4 α в течение суток перед постановкой функциональных тестов

и при их проведении клетки культивировали в среде с ингибиторами или ДМСО в качестве контроля.

Получение культур ГК HepG2 и Huh7 с подавленной экспрессией HNF4 α . Для получения культур с подавленной экспрессией HNF4 α были использованы лентивирусные векторы, экспрессирующие 4 разных малых шпилечных РНК (мшРНК; short hairpin RNA, shRNA), комплементарные участкам матричной РНК *HNF4A* (shHNF4 α), – pLKO.1-shHNF4 α (SHDNA-NM_000457, Sigma, США). Для получения контрольных культур использовали лентивирусный вектор, кодирующий мшРНК к последовательности зеленого флуоресцентного белка GFP (shGFP), – pLKO.1-shGFP (Sigma, США). Используемые векторы содержат ген устойчивости к пуromицину. Для получения лентивирусных частиц использовали систему ViraPower (Invitrogen, США), включающую векторы pLP1, pLP2 и pCMV-VSVg и пакующие клетки HEK293T, как описано ранее [14]. После трансдукции была проведена селекция в среде с антибиотиком: для HepG2 при концентрации пуromицина 5,5 мкг/мл, для Huh7 – 7,0 мкг/мл. По завершении селекции, когда неинфицированные клетки исходных культур погибли, были получены культуры HepG2-shGFP, Huh7-shGFP и 4 варианта культур HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α .

Анализ экспрессии генов. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Германия). Для получения комплементарной ДНК проводили обратную транскрипцию с использованием случайных гексамерных олигонуклеотидов (Синтол, Россия) и обратной транскриптазы MMLV-RT (Promega, США). В реакцию брали 2,5 мкг тотальной РНК.

Количественное определение уровня экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, Россия) с применением амплификатора Bio Rad IQ5 (Bio Rad Laboratories, США). Были использованы специфические праймеры: *TBP*-прямой 5'-gсacagagccсааgаgтgа-3', *TBP*-обратный 5'-acttсacatсacagctccсса-3', *HNF4A*-прямой 5'-gсgtgсgг-ааgаaccаса-3', *HNF4A*-обратный 5'-tgatccgгtccсgctcat-3', *HNF4AP1*-прямой 5'-atgtсaggtgttgacgаtg-3', *HNF4AP1*-обратный 5'-ctсgaggсaccgtagtgтт-3', *HNF4AP2*-прямой 5'-ggсcatggtсagcgtgаа-3', *HNF4AP2*-обратный 5'-ctсgaggсaccgtagtgтт-3', *CDH1*-прямой 5'-сggaggаgаgсggtgгtс-3', *CDH1*-обратный 5'-ggсaggгсgggааgаgа-3', *CDH2*-прямой 5'-accсaggааaggtgгсaggt-3', *CDH2*-обратный 5'-gсgggа-гaccсagтctct-3'. Температуры отжига для реакций с праймерами к генам: *TBP* – 62,8 °С, *HNF4A* – 62,7 °С, *HNF4AP1* – 62,7 °С, *HNF4AP2* – 62,7 °С, *CDH1* – 68,0 °С, *CDH2* – 63,5 °С. Количество комплементарной ДНК в образцах нормировали по уровню экспрессии гена *TBP*. Постановку ПЦР-РВ и обработку данных выполняли, как описано ранее [15].

Определение пролиферативного потенциала опухолевых клеток проводили путем оценки ДНК-синтети-

ческой активности клеток методом включения 5-бром-дезоксисуридина (5-BrdU) по протоколу, описанному ранее [14].

Определение миграционной активности клеток. Оценку способности клеток к направленной миграции выполняли в камерах Бойдена с диаметром пор 8,0 мкм (BD Falcon Cell Culture Insert, BD Biosciences, США) по схеме, описанной ранее [14]. В качестве аттрактанта для клеток использовали fetalную бычью сыворотку (HyClone, США), добавляя ее в культуральную среду до концентрации 7 %. В камеры Бойдена высевали по 30 тыс. клеток. Время теста составляло 24 ч.

Обработка данных. Эксперименты проведены не менее чем в 3 независимых повторах. Данные обрабатывали в программах Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, США) и Origin Pro 9.0 (Origin Lab Corporation, США). Для определения достоверности различий (порог $p < 0,05$) между группами данных использовали U-тест Манна–Уитни. Графическое представление результатов выполнено с применением программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

Результаты и обсуждение

Влияние подавления экспрессии HNF4 α на биологические свойства культур ГК HepG2 и Huh7. Для исследования эффектов подавления экспрессии HNF4 α на свойства культур ГК человека мы получили культуры HepG2 и Huh7, в которых транскрипция HNF4 α стабильно подавлена путем трансдукции лентивирусных векторов, экспрессирующих 4 разных варианта мшРНК, комплементарных последовательности матричной РНК *HNF4A* – HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α . В качестве контрольных использовали полученные аналогичным образом культуры HepG2 и Huh7, экспрессирующие мшРНК к последовательности гена *GFP*, – HepG2-shGFP и Huh7-shGFP. После инфекции клеток указанными лентивирусными векторами, содержащими ген устойчивости к пуromицину, проводили селекцию клеток в среде с пуromицином. По завершении селекции культуры HepG2-shGFP, Huh7-shGFP и 4 варианта культур HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α использовали для оценки уровня подавления экспрессии гена и синтеза белка HNF4 α методами обратной транскрипции – ПЦР-РВ и иммуноблоттинга соответственно. По результатам сравнения (данные не представлены) для каждой из культур ГК были выбраны варианты с наиболее выраженным подавлением HNF4 α , в которых методом ПЦР-РВ количественно определяли уровень снижения экспрессии HNF4 α и групп изоформ HNF4 α P1 и HNF4 α P2 по сравнению с контрольными культурами. В культурах ГК с нокдауном гена *HNF4A* произошло примерно двукратное подавление экспрессии HNF4 α и групп его изоформ (рис. 1).

Далее в экспериментах на культурах HepG2-shHNF4 α и Huh7-shHNF4 α исследовано влияние сниженной экспрессии HNF4 α на пролиферативную активность клеток

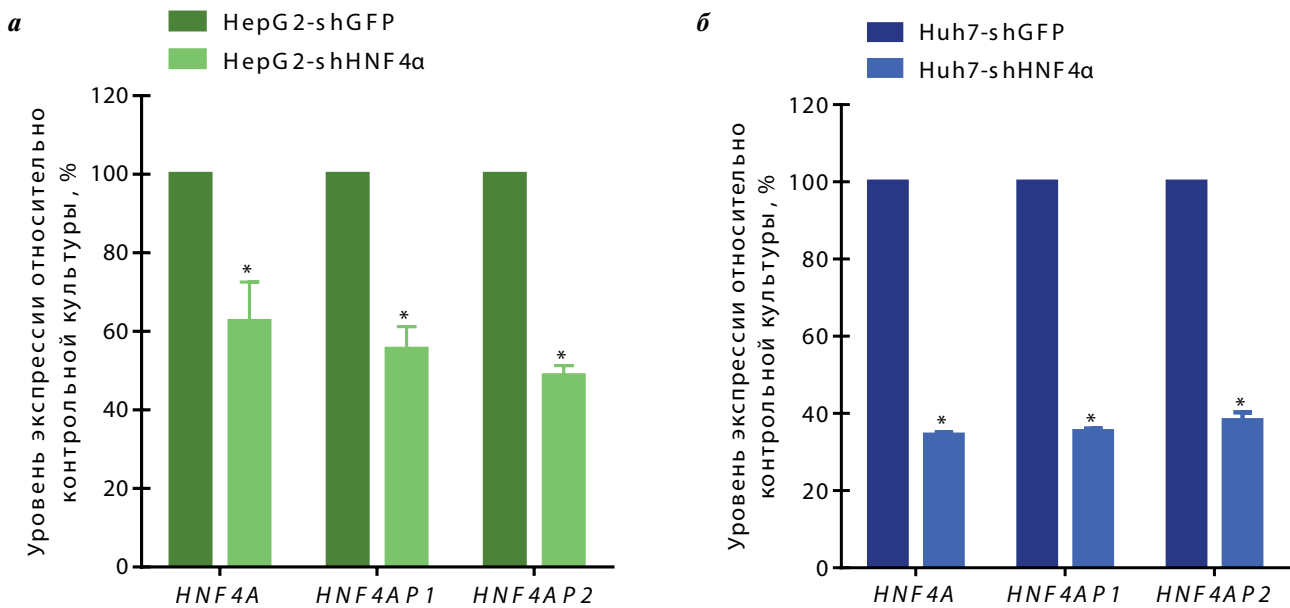


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии *HNF4α* и групп изоформ *HNF4α* в клетках *HepG2-shHNF4α* (а) и *Huh7-shHNF4α* (б). Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени. Формат данных: среднее значение \pm стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. * $p < 0,05$.

и их миграционную способность — ключевых свойств, обеспечивающих формирование злокачественного фенотипа опухолевых клеток.

Определение влияния нокдауна гена *HNF4A* на пролиферативный потенциал культур ГК, проведенное методом оценки включения 5-BrdU; показало, что в культурах *HepG2-shHNF4α* и *Huh7-shHNF4α* ДНК-синтетическая активность клеток по сравнению с контролем не изменилась (рис. 2а, б). Это может быть связано с тем, что в культурах *HepG2* и *Huh7* выявлена экспрессия мутантных вариантов онкогена *N-Ras* с активирующей мутацией Q61L и опухолевого супрессора p53 с инактивирующей мутацией Y220C соответственно [16], влияние которых может обуславливать исходно высокий пролиферативный потенциал этих культур.

Исследование миграционного потенциала культур ГК с подавленной экспрессией *HNF4α* показало, что способность к направленной миграции в камере Бойдена клеток культуры *HepG2-shHNF4α* в среднем почти в 4 раза выше по сравнению с *HepG2-shGFP* (рис. 2в), при этом *Huh7-shHNF4α* мигрируют более чем в 2 раза менее интенсивно, чем в контроле (рис. 2г).

Одним из механизмов регуляции миграционной активности клеток ГК является изменение состава кадгериновых клеточных контактов. Из литературы известно, что репрессия *HNF4α* в культурах ГК может вызывать подавление экспрессии E-кадгерина [8] и появление других кадгериновых контактов [17]. Ранее было показано, что повышение миграционной активности в иммортализованных гепатоцитах мыши с кратковременным нокдауном *HNF4α* ассоциировано с подавлением экспрессии E-кадгерина и увеличением экспрессии N-кадгерина [18]. Поэтому мы предположили, что на-

блюдающееся при нокдауне гена *HNF4A* изменение миграционного потенциала клеток ГК опосредовано нарушением экспрессии данных типов кадгеринов.

Количественная оценка экспрессии E-кадгерина (*CDH1*) и N-кадгерина (*CDH2*) методом ПЦР-РВ показала, что в клетках *HepG2-shHNF4α* (рис. 3а) увеличилась экспрессия *CDH2*, при этом экспрессия *CDH1* не изменилась. В клетках культуры *Huh7-shHNF4α* (рис. 3б) снизилась экспрессия обоих типов кадгеринов. Известно, что N-кадгерин играет важную роль в увеличении миграционной активности опухолевых клеток [19], поэтому мы предполагаем, что увеличение миграционной способности клеток *HepG2-shHNF4α* может быть связано с повышением уровня экспрессии N-кадгерина, а уменьшение миграционного потенциала клеток *Huh7-shHNF4α* опосредовано снижением экспрессии E-кадгерина и N-кадгерина.

Влияние активности проопухолевых сигнальных каскадов на биологические свойства культур ГК с подавленной экспрессией *HNF4α*. На основании данных литературы для анализа влияния нарушенной экспрессии *HNF4α* на проопухолевое действие сигнальных путей, ассоциированных с патогенезом ГК, мы выбрали ряд молекулярных каскадов, активность которых можно блокировать с помощью низкомолекулярных ингибиторов.

Активация mTOR-регулируемого сигнального пути является частым событием при гепатоканцерогенезе, что обуславливает включение ингибиторов mTOR в клинические испытания для выбора терапии ГК [2, 3]. В опытах *in vitro* при ингибировании mTOR наибольшая эффективность блокирования пролиферации клеток *HepG2* и *Huh7* среди структурных аналогов показана для рапамицина [20].

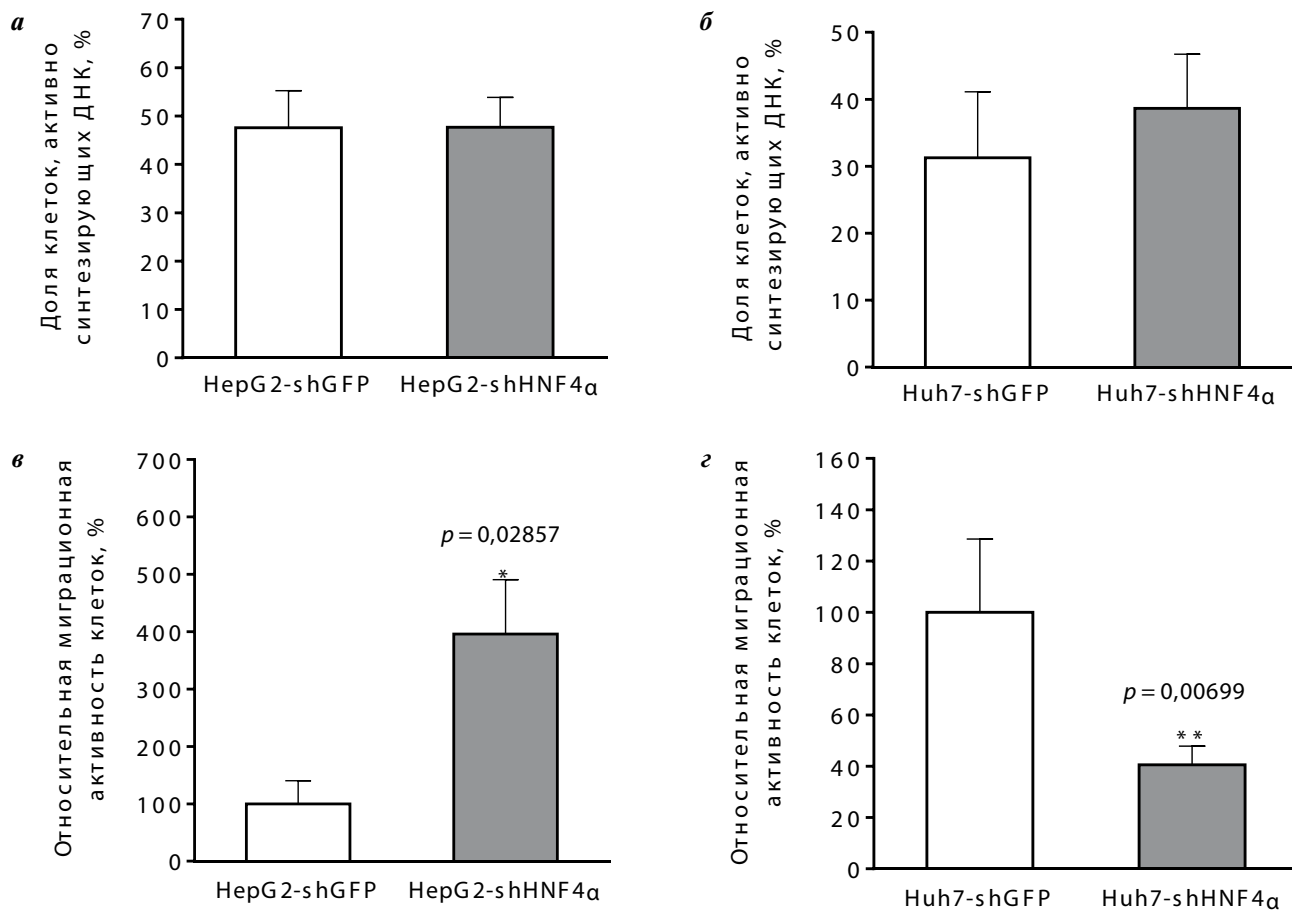


Рис. 2. Определение доли клеток, активно синтезирующих ДНК, методом включения метки 5-BrdU: HepG2-shGFP и HepG2-shHNF4α (а), Huh7-shGFP и Huh7-shHNF4α (б). Миграционный потенциал клеток HepG2-shHNF4α (в) и Huh7-shHNF4α (г), измеренный относительно контрольных культур HepG2-shGFP и Huh7-shGFP соответственно. Формат данных: среднее значение ± стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

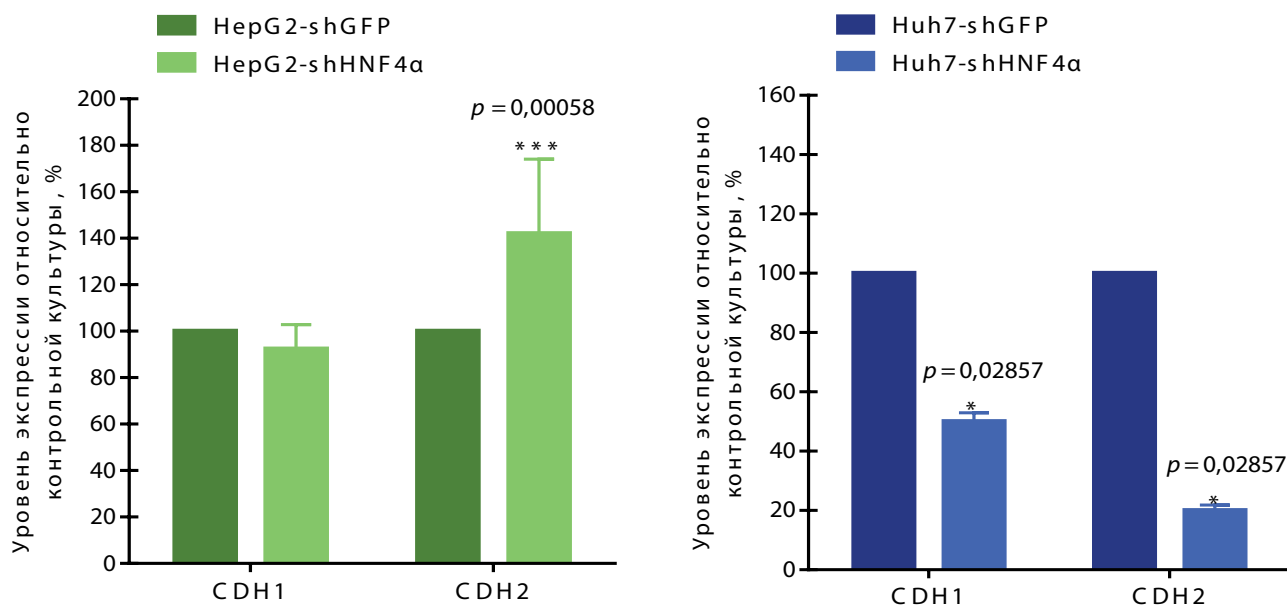


Рис. 3. Относительные уровни экспрессии E-кадгерина (CDH1) и N-кадгерина (CDH2) в клетках культур HepG2-shHNF4α (а) и Huh7-shHNF4α (б). Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени. Формат данных: среднее значение ± стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Вследствие частых мутаций регуляторов клеточного цикла в ГК [2, 3] ингибирование pRb-зависимого пути регуляции пролиферации представляется перспективным подходом для терапии этого типа опухолей [3]. Для терапии ГК зарегистрировано клиническое испытание II фазы ингибитора CDK4/6 PD0332991 (палбоциклиба), который препятствует CDK4/6-зависимой инактивации pRb [21]. В исследовании D.V. Rivadeneira и соавт. продемонстрирован значительный антипролиферативный эффект PD0332991 для культур HepG2 и Huh7 [22].

Ингибирование киназ ROCK1/2, одних из основных регуляторов клеточной подвижности, показало значительную эффективность для блокирования миграционной активности клеток ГК и уменьшения их метастатического потенциала. Одним из наиболее эффективных ингибиторов ROCK1/2 *in vitro* является Y27632 [12].

Таким образом, ингибиторы рапамицин, PD0332991 и Y27632 были выбраны как наиболее специфические и потенциально эффективные в отношении блокирования пролиферации и миграции культур HepG2 и Huh7. Для постановки экспериментов на культурах ГК *in vitro* мы определили оптимальные концентрации ингибиторов, руководствуясь данными о дозах и ингибирующих эффектах веществ на свойства клеток HepG2 и Huh7 [20, 22, 23], а также оценкой выживаемости клеток ГК при действии рапамицина, PD0332991 и Y27632, выполненной по результатам МТТ-теста (данные не приведены).

Следующим этапом работы стало проведение экспериментов по определению действия ингибиторов сигнальных путей mTOR, CDK4/6 и ROCK1/2 на биологические свойства культур HepG2 и Huh7 с подавленной экспрессией HNF4a – пролиферативную активность и миграционную способность.

По результатам тестов по оценке пролиферативного потенциала клеток методом включения 5-BrdU при действии рапамицина, PD0332991 и Y27632 значимого влияния подавления экспрессии HNF4a на интенсивность синтеза ДНК в клетках HepG2-shHNF4a и Huh7-shHNF4a относительно соответствующих контрольных культур не выявлено (данные не представлены).

Результаты теста на определение способности клеток к направленной миграции в камерах Бойдена для культур HepG2-shHNF4a и Huh7-shHNF4a при воздействии ингибиторов представлены на рис. 4. Действие рапамицина в концентрации 100 нМ вызывает большее снижение миграционной способности клеток культуры HepG2-shHNF4a по сравнению с HepG2-shGFP ($p = 0,02857$) (см. рис. 4а). Клетки культуры Huh7-shHNF4a оказались устойчивыми к ингибирующему миграцию действию рапамицина по сравнению с Huh7-shGFP ($p = 1,19 \times 10^{-5}$) (см. рис. 4б).

Действие PD0332991 в концентрации 1 мкМ существенно уменьшает миграционный потенциал клеток

культуры HepG2-shHNF4a по сравнению с контрольными ($p = 0,00622$) (см. рис. 4в). В клетках Huh7-shHNF4a ингибирование активности CDK4/6 вызвало достоверно меньшее снижение миграционной способности по сравнению с культурой Huh7-shGFP ($p = 1,03 \times 10^{-4}$) (см. рис. 4г).

Подавление экспрессии HNF4a в исследуемых культурах ГК приводит к снижению чувствительности клеток к действию Y27632 при концентрации 10 мкМ, блокирующему миграционную активность клеток. Миграционная способность клеток Huh7-shHNF4a под действием Y27632 оказалась достоверно выше, чем в контрольной культуре Huh7-shGFP ($p = 0,01399$) (см. рис. 4д). Сравнение миграционных потенциалов культур HepG2-shGFP и HepG2-shHNF4a выявило меньшую чувствительность HepG2-shHNF4a к ингибирующему действию Y27632 (см. рис. 4е), однако статистическая достоверность в этом случае не была достигнута ($p = 0,05714$).

Таким образом, подавление экспрессии HNF4a привело к уменьшению чувствительности клеток Huh7 к действию ингибиторов mTOR и CDK4/6, вызывающих снижение миграционной активности клеток. Это может быть объяснено сочетанием влияния мутантного варианта p53 с эффектами подавления экспрессии HNF4a в клетках Huh7. По данным литературы, нарушение функции p53 вызывает активацию сигнального пути Akt/mTOR, которая обуславливает повышение клеточной подвижности [24]. Вследствие того, что ген *CDKN1A* является транскрипционной мишенью p53 [25], инактивация последнего может приводить к ослаблению p21^{WAF1/CIP1}-зависимого подавления активности комплексов циклин D–CDK4 [26], для которых описана неканоническая функция контроля клеточной подвижности [27]. Такие молекулярные нарушения способствуют поддержанию высокого миграционного потенциала клеток Huh7 при ингибировании mTOR и CDK4/6. При нокдауне гена *HNF4A* в культуре Huh7 указанные эффекты могут усиливаться, поскольку снижение уровня HNF4a в клетках Huh7 вызывает активацию mTOR [28], и подавление экспрессии HNF4a может привести к снижению экспрессии гена *CDKN1A*, который является его прямой транскрипционной мишенью [29].

В культуре HepG2 при действии ингибиторов mTOR и CDK4/6 миграционная активность клеток с подавленной экспрессией HNF4a по сравнению с контрольной культурой значительно снижается. Таким образом, вызванное нокдауном гена *HNF4A* повышение миграционной способности культуры HepG2 (см. рис. 2в) может быть обусловлено влиянием mTOR- и CDK4/6-зависимых механизмов.

Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют роль экспрессии HNF4a в регуляции миграционной активности клеток ГК. Нокдаун гена *HNF4A*

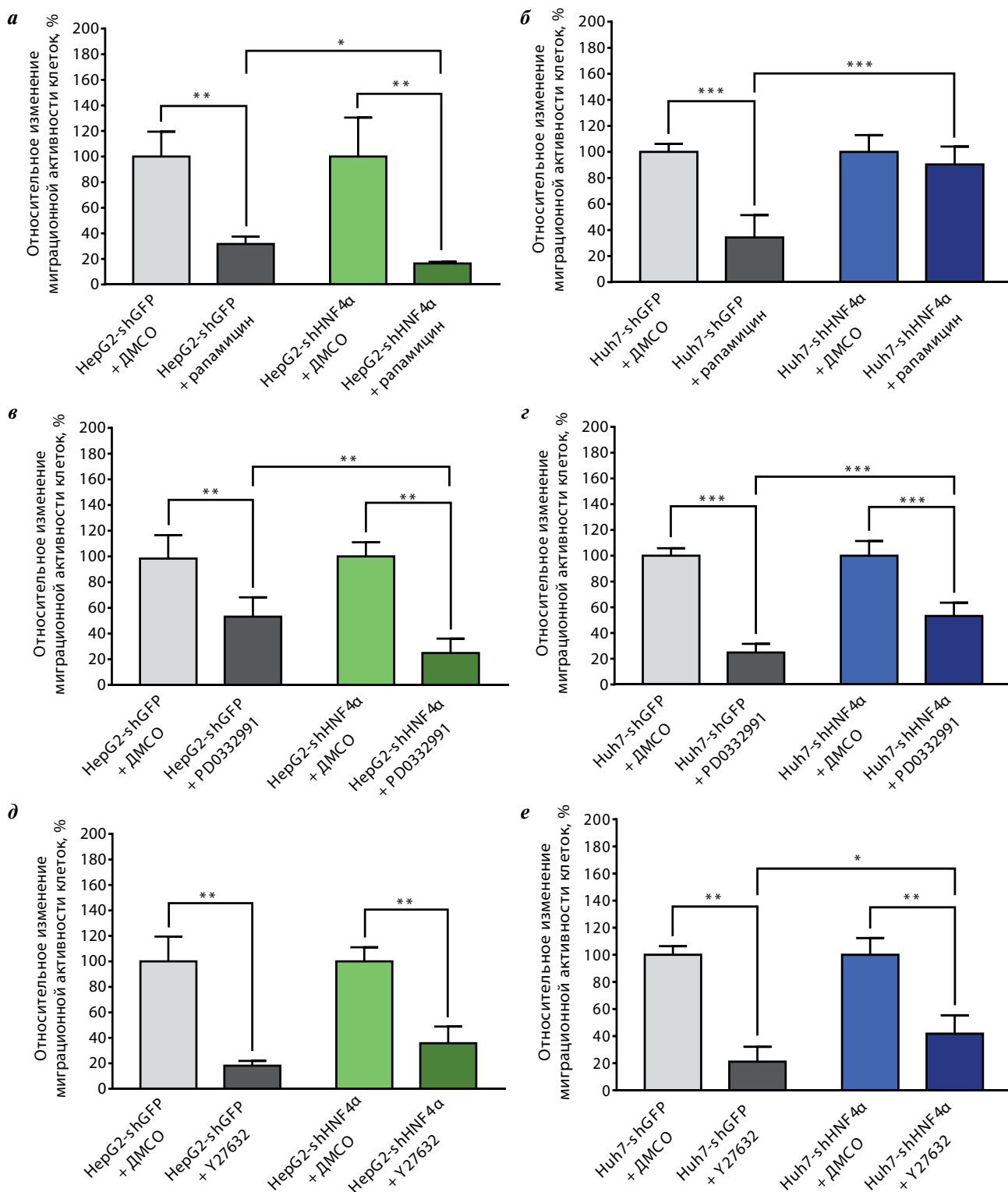


Рис. 4. Влияние ингибирования *mTOR*, *CDK4/6* и *ROCK1/2* на миграционную активность клеток гепатоцеллюлярной карциномы со сниженной экспрессией *HNF4α*. Относительное изменение миграционной способности культур *HepG2-shHNF4α* (а, в, д) и *Huh7-shHNF4α* (б, г, е) под действием 100 нМ рапамицина (а, б), 1 мкМ PD0332991 (в, г) и 10 мкМ Y27632 (д, е). Для каждой культуры проведено сравнение действия ингибитора относительно контроля (+ диметилсульфоксид (ДМСО)). Формат данных: среднее значение ± стандартное отклонение; U-тест Манна–Уитни. **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

в исследованных культурах ГК человека вызывает изменение миграционной способности клеток, ассоциированное с нарушением экспрессии Е-кадгерина и N-кадгерина. Полученные данные указывают на то,

что уровень экспрессии *HNF4α* является фактором, влияющим на чувствительность клеток ГК к действию ингибиторов проопухолевых сигнальных путей *mTOR*, *CDK4/6* и *ROCK1/2* на миграционную активность.

Повышение устойчивости клеток ГК с нокаутом гена *HNF4A* к ROCK-зависимому ингибированию миграционной активности характеризует участие *HNF4α* в негативной регуляции миграционной способности клеток, что указывает на его опухолесупрессорную

функцию. Различная чувствительность изучаемых культур ГК к блокированию миграционной активности клеток при ингибировании mTOR и CDK4/6, вероятно, определяется спектром онкогенных мутаций, характерных для каждой культуры.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. 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.
3. 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.
4. Лазаревич Н.Л., Флейшман Д.И. Тканеспецифические транскрипционные факторы в прогрессии эпителиальных опухолей. *Биохимия* 2008;73(5):735–50. [Lazarevich N.L., Fleishman D.I. Tissue-specific transcription factors in the progression of epithelial tumors. *Biochimica = Biochemistry* 2008;73(5):735–50. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0006297908050106. PMID: 18605982.
5. Thomas H., Jaschowitz K., Bulman M. et al. A distant upstream promoter of the *HNF4α* gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet* 2001;10(19):2089–97. PMID: 11590126.
6. Torres-Padilla M.E., Fougère-Deschattre C., Weiss M.C. Expression of *HNF4α* isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3 end splicing. *Mech Dev* 2001;109(2):183–93. PMID: 11731232.
7. Lazarevich N.L., Shavochkina D.A., Fleishman D.I. et al. Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression. *Exp Oncol* 2010;32(3):167–71.
8. Lazarevich N.L., Cheremnova O.A., Varga E.V. et al. Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* 2004;39(4):1038–47. DOI: 10.1002/hep.20155. PMID: 15057908.
9. Yin C., Lin Y., Zhang X. et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor 4 alpha gene. *Hepatology* 2008;48(5):1528–39. DOI: 10.1002/hep.22510. PMID: 18925631.
10. Ning B.F., Ding J., Yin C. et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2010;70(19):7640–51. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0824. PMID: 20876809.
11. Hatzia Apostolou M., Polyarchou C., Aggelidou E. et al. An *HNF4α*-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell* 2011;147(6):1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.043. PMID: 22153071.
12. Wong C.C., Wong C.M., Au S.L. et al. RHO GTPases and RHO-effectors in hepatocellular carcinoma metastasis: ROCK N^oRHO move it. *Liver Int* 2010;30(5):642–56. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02232.x. PMID: 20726051.
13. Omar H.A., Tolba M.F., Hung J.H. et al. OSU-2S/Sorafenib synergistic antitumor combination against hepatocellular carcinoma: the role of PKCδ/p53. *Front Pharmacol* 2016;(7):463. DOI: 10.3389/fphar.2016.00463. PMID: 27965580.
14. Чесноков М.С., Кустова И.Ф., Шавочкина Д.А. и др. Частичная редифференцировка и понижение выраженности черт злокачественного фенотипа клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека при экспрессии ядерного рецептора *HNF4α*. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;(3):17–23. [Chesnokov M.S., Kustova I.F., Shavochkina D.A. et al. Partial redifferentiation and decrease in the severity of the malignant phenotype of cells of human pancreatic ductal adenocarcinoma in the expression of the nuclear receptor *HNF4α*. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2012;(3):17–23. (In Russ.)].
15. Chesnokov M.S., Krivtsova O.M., Skovodnikova P.A. et al. Transcriptome-based identification of PDGFA as a candidate secreted biomarker for hepatocellular carcinoma. *Biopolymers and Cell* 2016;32(6):418–28. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000939>.
16. Barretina J., Caponigro G., Stransky N. et al. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483(7391):603–7. DOI: 10.1038/nature11003. PMID: 22460905.
17. Späth G.F., Weiss M.C. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 1998;140(4):935–46. PMID: 9472044.
18. Santangelo L., Marchetti A., Cicchini C. et al. The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4α. *Hepatology* 2011;53(6):2063–74. DOI: 10.1002/hep.24280. PMID: 21384409.
19. Hazan R.B., Phillips G.R., Qiao R.F. et al. Exogenous expression of N cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148(4):779–90. DOI: 10.1002/hep.24280. PMID: 21384409.
20. Pivonello C., Negri M., De Martino M.C. et al. The dual targeting of insulin and insulin-like growth factor I receptor enhances the mTOR inhibitor-mediated antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(9):9718–31. DOI: 10.18632/oncotarget.6836. PMID: 26756219.
21. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01356628>.
22. Rivadeneira D.B., Mayhew C.N., Thangavel C. et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells. *Gastroenterology* 2010;138(5):1920–30. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.007. PMID: 20100483.
23. Lontay B., Kiss A., Gergely P. et al. Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* 2005;17(10):1265–75. DOI: 10.1016/j.cellsig.2005.01.008. PMID: 16038801.
24. Guo F., Gao Y., Wang L. et al. p19Arf-p53 tumor suppressor pathway regulates cell motility by suppression of phosphoinositide 3-kinase and Rac1 GTPase activities. *J Biol Chem* 2003;278(16):14414–9. DOI: 10.1074/jbc.M300341200. PMID: 12578823.
25. el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75(4):817–25. PMID: 8242752.
26. Paternot S., Bockstaele L., Bisteau X. et al. Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle* 2010;9(4):689–99. DOI: 10.4161/cc.9.4.10611. PMID: 20107323.

27. Fusté N.P., Fernández-Hernández R., Cemeli T. et al. Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin. *Nat Commun* 2016;7:11581. DOI: 10.1038/ncomms11581. PMID: 27181366.
28. Yang Y.M., Lee C.G., Koo J.H. et al. G α 12 overexpressed in hepatocellular carcinoma reduces microRNA-122 expression via HNF4 α inactivation, which causes c-Met induction. *Oncotarget* 2015;6(22):19055–69. DOI: 10.18632/oncotarget.3957. PMID: 25965999.
29. Chiba H., Itoh T., Satohisa S. et al. Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Exp Cell Res* 2005;302(1):11–21. DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.08.014. PMID: 15541721.

Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование

С.Е. Семина¹, Е.А. Руденская¹, А.Г. Миттенберг², С.В. Шабельников², М.А. Красильников¹

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

²ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук»; Россия, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

Контакты: Светлана Евгеньевна Семина s.e.semina@gmail.com

Цель работы – исследование роли межклеточных взаимодействий в развитии резистентности клеток рака молочной железы к метформину – антидиабетическому препарату из группы бигуанидов, обладающему выраженным противоопухолевым эффектом.

Результаты. В основу работы легли данные, полученные нами ранее при изучении гормональной резистентности клеток рака молочной железы и продемонстрировавшие возможность передачи резистентного фенотипа горизонтальным путем, от клетки к клетке, в том числе с участием экзосом.

В настоящей работе мы показали возможность развития устойчивости к метформину горизонтальным путем, как и в случае гормональной резистентности. Установлено, что решающим фактором в подобном горизонтальном пути передачи резистентности являются межклеточные взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых метформинрезистентными клетками. Анализ протеома экзосом подтвердил присутствие в экзосомах резистентных клеток белков, регулирующих ответ клеток на действие апоптотических агентов.

Заключение. Полученные данные подтверждают существование неизвестного ранее механизма распространения резистентности, основанного на межклеточных взаимодействиях, и открывают новые возможности в поиске мишеней противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, резистентность, метформин, экзосомы, межклеточное взаимодействие, протеом

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-92-98

Exosomes and development of cancer cell resistance to metformin: pilot study

S.E. Semina¹, E.A. Rudenskaya¹, A.G. Mittenberg², S.V. Shabel'nikov², M.A. Krasil'nikov¹

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

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences; 4 Tikhoretskiy Prospekt, Saint Petersburg 194064, Russia

Objective: to study the role of the intercellular interactions in the progression of the cancer cells resistance to metformin, a biguanide antidiabetic drug exhibited the marked anti-tumor activity.

Results. Earlier we have demonstrated the effect of horizontal transferring of hormonal resistance of breast cancer cells from cell to cell, and showed the key role of exosomes on the transferring of the resistance.

Here we have shown the effect of the horizontal transferring of metformin resistance in breast cancer cells – similar to the progression of hormonal resistance. We found that horizontal transferring of the metformin resistance is mediated via exosomes secreted by the resistant cells. The proteome analysis of the exosomes revealed several proteins differentially expressed in the exosomes of metformin-resistant cells and associated with the regulation of cell response to apoptotic drugs.

Conclusions. Totally, the data presented demonstrate the new mechanism of the development of the cancer cell resistance based on the intercellular interactions, opening the new insights in the target therapy of breast cancer.

Key words: breast cancer, resistance, metformin, exosomes, intercellular interactions, proteome

Введение

Известно, что одним из основных факторов, снижающих эффективность противоопухолевых препаратов, является резистентность образований к их действию – либо врожденная, либо приобретенная в процессе терапии. В тех случаях, когда речь идет о таргетных средствах, на первый план среди причин подобной резистентности

выходит реаранжировка внутриклеточных сигнальных путей, обеспечивающая передачу ростового сигнала в обход заблокированных белков.

Сравнительно недавно внимание исследователей привлек метформин – антидиабетический препарат из группы бигуанидов, с успехом применяющийся для лечения сахарного диабета 2-го типа.

Целый ряд клинико-эпидемиологических исследований показал, что этот препарат существенно снижает риск развития онкологических заболеваний и проявляет высокую противоопухолевую активность как *in vivo*, так и *in vitro* [1, 2]. Более того, изучение механизма действия бигуанидов продемонстрировало, что их антипролиферативная активность реализуется как минимум частично, через активацию аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) и AMPK-зависимое подавление сигналинга mTOR (мишень рапамицина в клетках млекопитающих) [3, 4].

Вопрос о резистентности опухолей к препаратам, действующим на AMPK/mTOR-сигнальный путь, несмотря на очевидную актуальность, практически не исследован во многом из-за относительно непродолжительного опыта их применения в качестве противоопухолевых соединений. Известны лишь единичные работы, в которых изучалось развитие устойчивости рака молочной железы (РМЖ) к ингибитору mTOR эверолимусу [5] и метформину [6] и описывались изменения отдельных сигнальных каскадов в основном пролиферативного и промембранного профилей при развитии резистентности.

Ранее в экспериментах, выполненных на культивируемых *in vitro* клетках аденокарциномы молочной железы линии MCF-7, мы показали, что длительное, в течение 60 сут, культивирование клеток MCF-7 с метформинном приводит к развитию их устойчивости к цитостатическому действию метформина, сохраняющемуся на протяжении не менее 80 пассажей. Было обнаружено, что такие клетки, обозначенные нами как MCF-7/M, отличаются, наряду с активацией некоторых сигнальных путей (PI3K/Akt, Snail1), заметным снижением транскрипционной активности рецептора эстрогена и, соответственно, частичной резистентностью к антипролиферативному действию антиэстрогенов [7].

Цель исследования — изучение механизма развития резистентности клеток РМЖ к метформину, в частности, роли межклеточных взаимодействий в развитии такой резистентности. В основу работы легли данные, полученные нами ранее при изучении гормональной резистентности клеток линии MCF-7 и продемонстрировавшие возможность передачи резистентного фенотипа горизонтальным путем, от клетки к клетке, в том числе с участием экзосом [8]. В настоящей работе мы показали, что устойчивость к метформину может передаваться от резистентных к чувствительным клеткам при их совместном культивировании, продемонстрировали участие экзосом в таком распространении резистентности и исследовали основные особенности белкового спектра экзосом чувствительных и резистентных клеток.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки РМЖ человека линии MCF-7 культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 7 % эмбриональную сыворотку телят (FBS HyClone, США) и гентамицин (50 ед/мл) (ПанЭко, Россия), при 37 °С и 5 % CO₂. При анализе скорости роста и чувствительности к метформину и/или тамоксифену количество клеток определяли либо при подсчете в камере Горяева, либо с использованием МТТ-теста, основанного на утилизации живыми клетками реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразол бромид).

Трансфекция клеток. Трансфекцию клеток плазмидой pEGFP-N1 (предоставлена Д.Е. Андреевым, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. Ломоносова, Москва) проводили в течение 4 ч с использованием реагента Metafectene PRO (Biontech Laboratories GmbH, Германия) при температуре 37 °С. Селекцию клеток выполняли в присутствии G-418 в течение 14 сут. Эффективность трансфекции и последующей селекции оценивали при определении количества флуоресцирующих GFP-позитивных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа AxioPlan 2 ZEISS (Carl Zeiss, Германия).

Для определения транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили трансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген-репортер люциферазы под контролем промотора с эстроген-респонсивным элементом, любезно предоставленной Dr. George Reid [9]. Для контроля за эффективностью и потенциальной токсичностью процедуры трансфекции применяли котрансфекцию клеток плазмидой, содержащей ген β-галактозидазы. Все последующие эксперименты на клетках-трансфектантах выполняли в течение 48 ч после окончания трансфекции. Активность люциферазы измеряли по стандартному протоколу (Promega, США) на люминометре Turner BioSystems 20/20n (США). Расчет активности люциферазы проводили в условных единицах (отношение общей активности люциферазы к активности галактозидазы в исследованных образцах).

Выделение и характеристика препаратов экзосом. Экзосомы выделяли из кондиционированной культуральной среды по стандартной методике, описанной С. They и соавт. [10]. Клетки культивировали в течение 4 сут в стандартной среде, затем культуральную жидкость в равных объемах с каждой линии собирали и последовательно центрифугировали 30 мин при 300 g и 6000 g, и 2 ч при 100 000 g. После каждого центрифугирования супернатант переносили в новые пробирки, конечный осадок растворяли в 500 мкл PBS. Все работы выполняли с соблюдением стерильных условий. Для проведения иммуноблоттинга препараты экзосом лизировали в буфере следующего состава: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 мкг/мл апротинина, лейпептина и пепстатина, 1 mM NaF и 1 mM ортованадат Na. Обра-

цы центрифугировали (10 000 g, 10 мин, 40 °С) и проводили стандартный электрофорез и иммуноблоттинг как описано ранее [8], с использованием антител к CD81 (BioLegend, США) и β -актину (Cell Signaling, США).

Протеомный анализ. Масс-спектрометрический анализ LC–МАЛДИ проводили на приборе AB Sciex 5800 TOF/TOF (AB Sciex, Германия) в режиме рефлектрона (МС) и tandemной масс-спектрометрии (МС/МС). Данные о масс-спектрах направляли в программу Protein Pilot v. 4.0, использующую поисковую машину Mascot для анализа масс-спектров с помощью международных баз данных (SwissProt, UniProt, NCBI) для идентификации пептидов и определения белков.

Хроматографическое разделение пептидов выполняли в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Милихром (Россия), совмещенном с МАЛДИ-споттером. Использовали колонку с обращенной фазой Jupiter Proteo C12, мертвый объем колонки 350 мкл (7 мин). Пептиды с колонки смывали градиентом ацетонитрила (от 10 до 50 %) с 0,1 % трифторуксусной кислоты в объеме 2,3 мл.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Развитие резистентности клеток к метформину: роль межклеточных взаимодействий. Эксперименты проводили на клетках РМЖ линии MCF-7 и метформинрезистентной сублинии MCF-7/М, полученной в результате длительного культивирования родительских клеток MCF-7 с метформином.

Клетки MCF-7/М были трансфицированы плазмидой рEGFP-N1, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), с последующей селекцией GFP-позитивных клонов. В результате селекции были выделены стабильные клоны с содержанием GFP-позитивных клеток ≥ 98 %, достаточным для проведения дальнейших экспериментов. Экспрессия GFP сохранялась на высоком уровне, достаточном для детекции клеток, на протяжении не менее 2 мес культивирования (рис. 1а). В дальнейших экспериментах по совместному культивированию родительских клеток MCF-7 (GFP-негативных) с резистентными (GFP-позитивными) клетками MCF-7/М и определению чувствительности обеих линий к метформину мы обнаружили, что кокультивирование этих 2 линий в течение 10 сут приводит к развитию частичной резистентности к метформину у родительских клеток MCF-7 (рис. 1б). Примечательно, что уровень чувствительности резистентных клеток MCF-7/М/GFP в этих условиях не изменяется (рис. 1в).

Для того чтобы исключить артефакты, вызванные возможной контаминацией пула родительских клеток клетками MCF-7/М/GFP, потерявшими способность

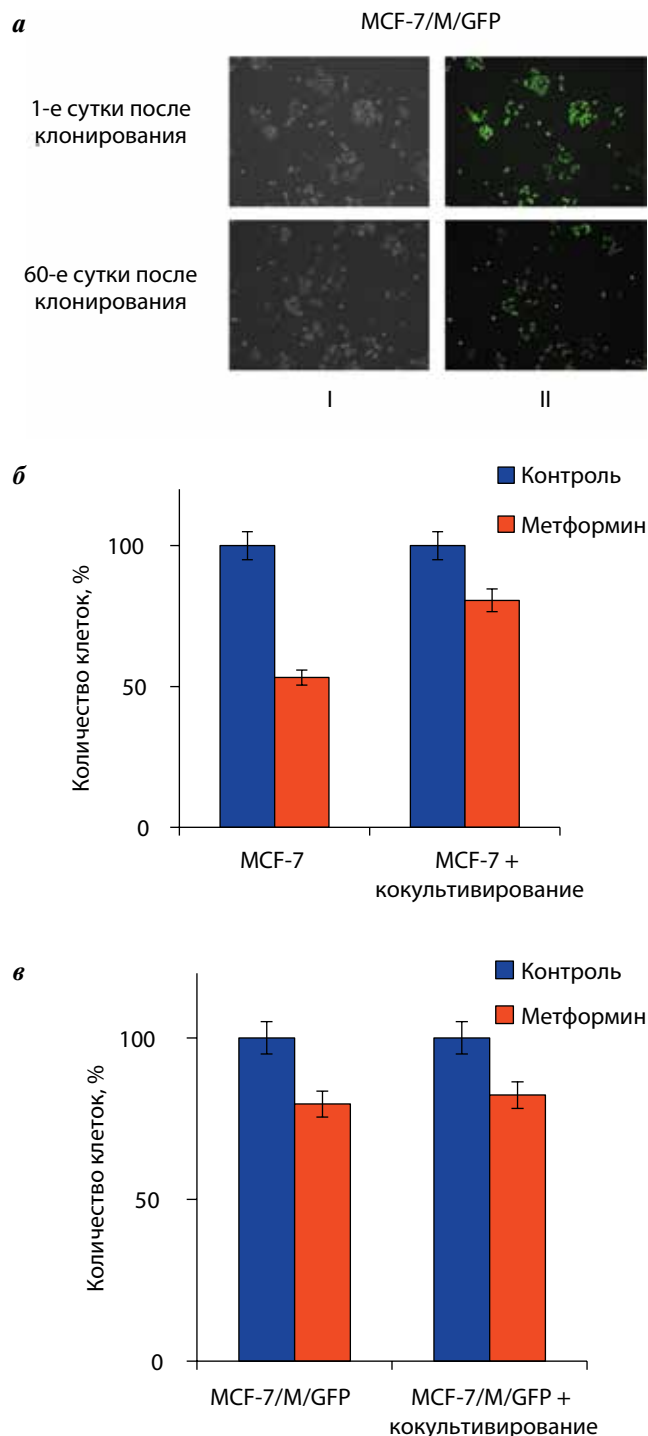


Рис. 1. Кокультивирование метформинчувствительных и резистентных клеток MCF-7 и MCF-7/М: клетки MCF-7/М, трансфицированные плазмидой рEGFP-N1. Доля GFP-позитивных клеток в популяции составляет ≥ 98 %. I – общий вид клеток MCF-7/М при световой микроскопии; II – флуоресценция GFP-позитивных клеток MCF-7/М/GFP через 1 и 60 сут после клонирования (а). Влияние на чувствительность к метформину совместного культивирования клеток MCF-7 и MCF-7/М/GFP. Клетки MCF-7 и MCF-7/М/GFP кокультивировали в течение 10 сут в стандартной среде. Затем добавляли метформин в концентрации 5 мкМ на 3 сут и определяли количество нефлуоресцирующих клеток MCF-7 (б) и флуоресцирующих клеток MCF-7/М/GFP (в) в камере Горяева. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 4 независимых экспериментах

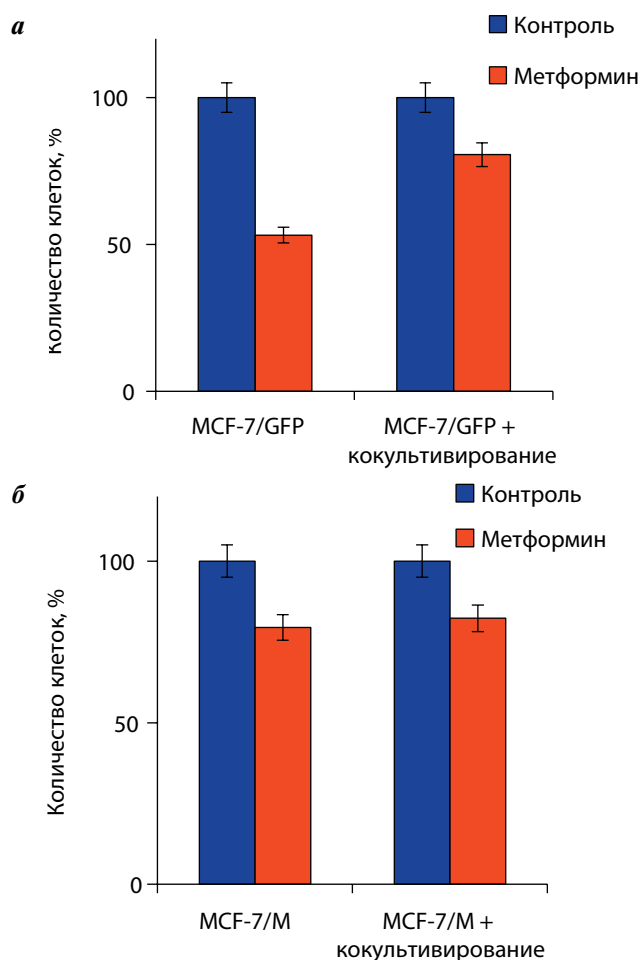


Рис. 2. Перекрестный эксперимент: влияние совместного культивирования клеток MCF-7/GFP и MCF-7/M на чувствительность к метформину. Предварительно клетки MCF-7 были трансфицированы плазмидой rEGFP-N1, затем клетки MCF-7/GFP и MCF-7/M кокультивировали в течение 10 сут с последующим определением чувствительности к метформину клеток MCF-7/GFP (а) и MCF-7/M (б). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 3 независимых экспериментах

к экспрессии GFP, проведены перекрестные эксперименты, в которых уже родительские клетки MCF-7 были трансфицированы GFP-плазмидой, и полученные клетки MCF-7/GFP кокультивировали с нетрансфицированными клетками MCF-7/M. В результате этих экспериментов были получены сходные результаты: через 10 сут кокультивирования в клетках MCF-7/GFP развивалась резистентность к метформину (рис. 2а). Соответственно, уровень чувствительности к метформину у резистентных клеток MCF-7/M в этих условиях также не изменяется (рис. 2б). Все дальнейшие эксперименты проводили с использованием первого варианта кокультивирования: MCF-7 + MCF-7/M/GFP.

Эффект перекрестной резистентности к метформину и тамоксифену. Как уже отмечалось, исходная сублиния MCF-7/M, резистентная к метформину, отличается перекрестной резистентностью к метформину и тамоксифену. Этот эффект предположительно связан с подавлением активности рецептора эстрогенов в клетках

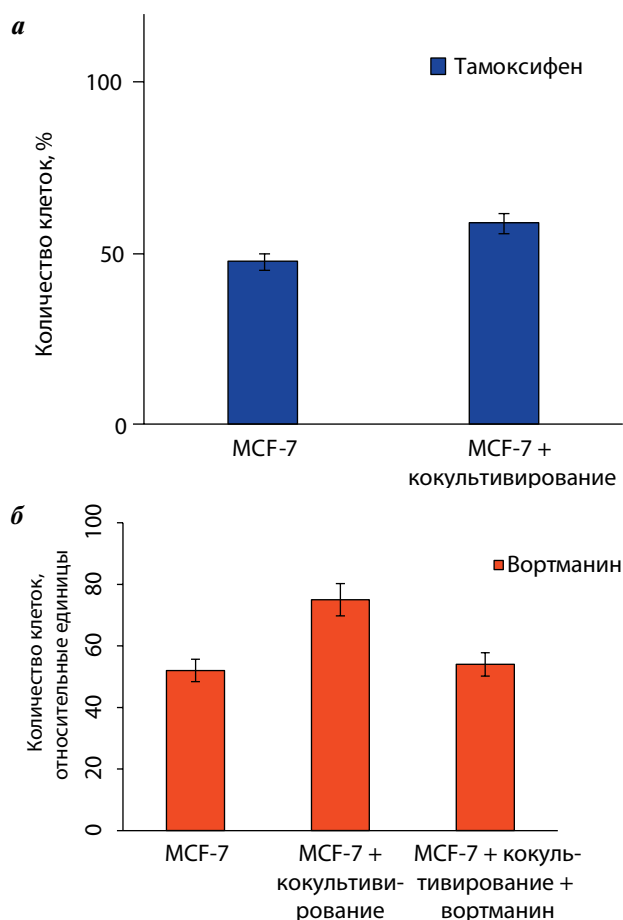


Рис. 3. Эффект кокультивирования клеток MCF-7 и MCF-7/M: чувствительность к тамоксифену и вортманину: а – влияние на чувствительность к тамоксифену совместного культивирования клеток MCF-7 и MCF-7/M/GFP. К клеткам MCF-7 и MCF-7/M/GFP после совместного культивирования добавляли тамоксифен в концентрации 5 мкМ на 3 сут и определяли количество клеток как описано выше; б – влияние вортманина на эффективность совместного культивирования клеток MCF-7 и MCF-7/M. Клетки MCF-7 и MCF-7/M/GFP кокультивировали в течение 10 сут в присутствии 5 мкМ вортманина и без него с последующим определением чувствительности клеток MCF-7 к метформину. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 3 независимых экспериментах

MCF-7/M [7]. Мы обнаружили, что клетки MCF-7 с резистентностью к метформину, приобретенной в процессе кокультивирования с клетками MCF-7/M, также характеризуются перекрестной резистентностью к тамоксифену (рис. 3а).

С учетом того, что перекрестная резистентность клеток MCF-7/M к метформину развивается на фоне активированного mTOR/PI3K/Акт-сигналинга [7], в следующей серии экспериментов исследовали роль PI3K в развитии резистентности, приобретенной при кокультивировании клеток. Было обнаружено, что кокультивирование родительских и метформинрезистентных клеток в присутствии ингибитора PI3K вортманина полностью блокирует распространение резистентности на родительские клетки, что свидетельствует о ключевой роли mTOR/PI3K/Акт-сигналинга в развитии приобретенной резистентности (рис. 3б).

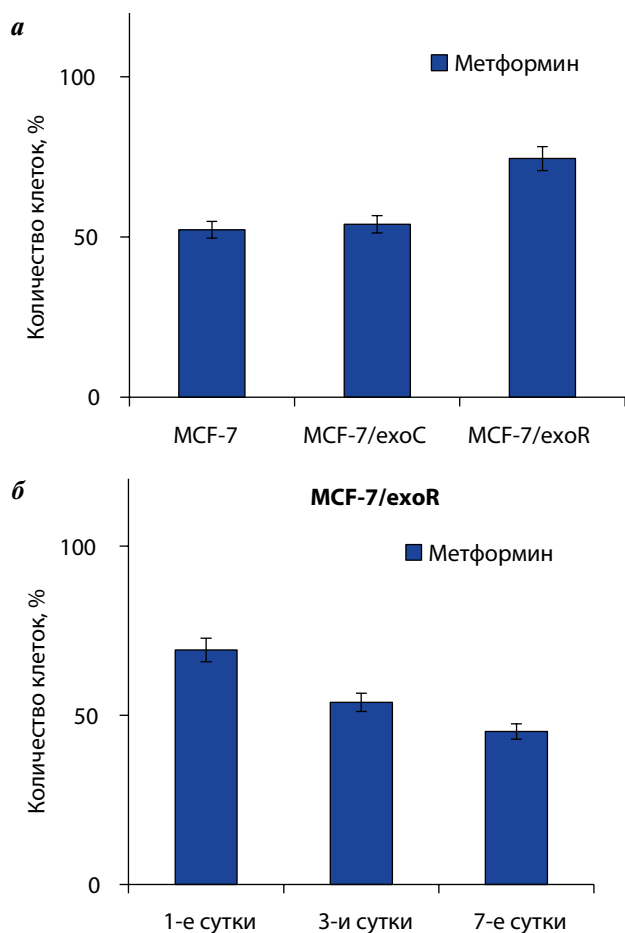


Рис. 4. Экзосомы и резистентность к метформину. Клетки MCF-7 культивировали в присутствии экзосом, полученных от клеток MCF-7(exoC) и MCF-7/M(exoR), в течение 14 сут и определяли чувствительность к метформину как описано выше (а). Параллельно продолжали культивирование клеток в среде без экзосом и определяли чувствительность к метформину на 1, 3 и 7-е сутки после отмены экзосом (б). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 4 независимых экспериментах

Роль экзосом в развитии резистентности к метформину. Экзосомы — везикулы или мультивезикулярные комплексы, секретируемые клетками в окружающую среду, одним из важнейших свойств которых является их способность перемещаться между клетками, проходить в кровяное русло, достигая самых различных тканей, и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов. Задачей настоящего этапа исследования стало изучение роли экзосом в межклеточной коммуникации и распространение резистентности горизонтальным путем — от клетки к клетке.

Препараты экзосом получали из кондиционированной культуральной среды метформинчувствительных клеток MCF-7 и резистентных клеток MCF-7/M методом высокоскоростного центрифугирования. Присутствие экзосом в полученных препаратах было верифицировано с помощью иммуноблоттинга с антителами к специфическому маркеру экзосом CD81 и методом линии просвечивающей электронной ми-

кроскопии, как описано в разделе «Материалы и методы».

Для изучения роли экзосом в развитии резистентности к метформину клетки MCF-7 культивировали в присутствии экзосом, полученных от метформинрезистентных клеток MCF-7/M. В качестве контроля использовались экзосомы родительских клеток MCF-7. Обнаружено, что регулярное добавление (в течение 14 сут) к клеткам MCF-7 экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/M, приводит к выраженному снижению чувствительности клеток MCF-7 к метформину (MCF-7/exoR). В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью, и их добавление не приводит к изменению метода чувствительности клеток (MCF-7/exoC) (рис. 4а). Отмена экзосом сопровождается постепенным восстановлением чувствительности клеток MCF-7 к метформину (рис. 4б).

Выше уже отмечалось, что для метформинрезистентных клеток MCF-7/M характерны снижение транскрипционной активности рецептора эстрогена и частичная резистентность к антипролиферативному действию тамоксифена. Изучение клеток, полученных после обработки экзосомами, показало, что длительное культивирование клеток MCF-7 с экзосомами резистентных клеток вызывает сходные изменения эстрогенового сигналинга: снижение активности рецептора эстрогенов и частичную резистентность к тамоксифену — в отличие от клеток, обработанных контрольными экзосомами (рис. 5).

Сравнительный масс-спектрометрический анализ протеома экзосом клеток MCF-7 и MCF-7/M. Цель настоящего эксперимента — сравнительный анализ протеома экзосом родительских клеток MCF-7 и метформинрезистентных клеток MCF-7/M. Протеомный анализ проводили на тандемном времяпролетном масс-спектрометре AB Sciex 5800 TOF/TOF (AB Sciex, Германия) с последующим анализом идентифицированных пептидов с помощью программного обеспечения Protein Pilot v.4.0 с использованием международных баз данных (SwissProt, UniProt, NCBI).

Всего в экзосомах клеток MCF-7 были идентифицированы 57 белков, в экзосомах клеток MCF-7/M — 48 белков. Среди последних выявлены 7 белков, дифференциально экспрессированных в экзосомах клеток MCF-7/M по сравнению с клетками MCF-7, в их числе 3 белка с выраженными антиапоптотическими/цитопротективными свойствами: Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 [11], Hornerin [12], myosin 4 [13].

Белки, дифференциально экспрессированные в клетках MCF-7/M

Белок	Ген
Tubulin alpha 4A chain	TUBA4A
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1
Myosin 4	MYH4
Myosin 13	MYH13

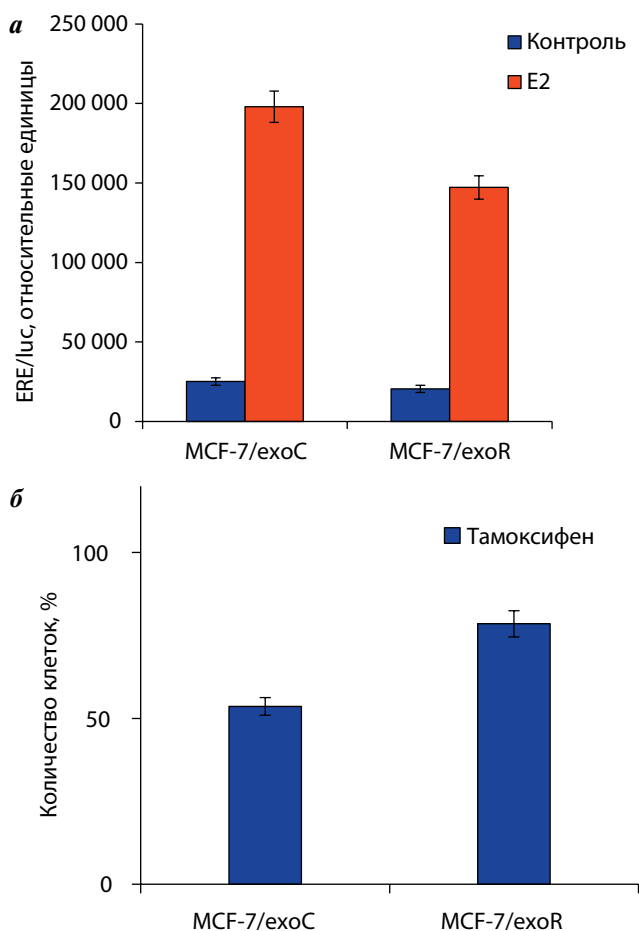


Рис. 5. Экзосомы и гормональная зависимость: а – транскрипционная активность рецептора эстрогенов. Клетки MCF-7 культивировали в присутствии экзосом, полученных от клеток MCF-7 и MCF-7/M, в течение 14 сут. Активность рецептора эстрогенов определяли методом репортерного анализа в отсутствие экзогенного эстрогена и после стимуляции клеток 17 β -эстрадиолом (E2) в концентрации 10–8 М в течение 24 ч. Результаты для каждого образца представлены как отношение активности люциферазы к активности галактозидазы; б – чувствительность клеток MCF-7 к тамоксифену после культивирования с экзосомами. К клеткам MCF-7 после культивирования с экзосомами добавляли тамоксифен в концентрации 5 мкМ на 3 сут и определяли количество клеток, как описано выше. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение значений, полученных в 3 независимых экспериментах

Hornerin	HRNR
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	CIQTNF3
Phosphoglycerate kinase 2	PGK2

Мы рассчитываем, что продолжение этих исследований, в том числе дальнейшее изучение роли

идентифицированных выше белков в формировании резистентного фенотипа клеток, позволит установить некоторые из путей передачи резистентности с помощью экзосом.

Заключение

Выше уже отмечалось, что при исследовании механизма развития резистентности клеток РМЖ к эстрогенам/антиэстрогенам мы продемонстрировали возможность распространения гормональной резистентности от клетки к клетке при совместном культивировании чувствительных и резистентных клеток и показали участие экзосом в этом процессе. Следующий вопрос был вполне логичным: характерны ли обнаруженные закономерности только для случая гормональной резистентности, или подобный путь может распространяться и на другие варианты резистентности? В настоящей работе мы исследовали механизм формирования резистентности клеток РМЖ к метформину – соединению из группы бигуанидов. Выбор для работы именно этого соединения был обусловлен 2 основными факторами. С одной стороны, метформин принадлежит к совершенно отличному от стероидов классу соединений, и его противоопухолевая активность ассоциирована, преимущественно, с подавлением АМПК и mTOR-сигналинга [14]. С другой стороны, в основе приобретенной резистентности к метформину лежит компенсаторная реактивация сигнальных путей [7], как и в случае гормональной резистентности, что могло свидетельствовать о существовании общих механизмов распространения обоих видов резистентности.

В результате проведенных исследований мы продемонстрировали возможность развития резистентности к метформину горизонтальным путем, от клетки к клетке, как и в случае гормональной резистентности. Установлено, что решающим фактором при подобном пути передачи резистентности являются межклеточные взаимодействия, реализуемые в том числе с участием экзосом, продуцируемых резистентными клетками. Анализ протеома экзосом подтвердил присутствие в экзосомах резистентных клеток белков, регулирующих ответ клеток на действие апоптотических агентов. Мы полагаем, что дальнейшее изучение способов развития и передачи резистентности, а также механизмов сообщения клеток друг с другом позволит установить пути и механизмы формирования резистентного фенотипа клеток и выявить новые мишени действия противоопухолевых препаратов.

Финансирование. Работа профинансирована из средств гранта Российского научного фонда № 14-15-00 362 (эксперименты разделов № 1–3) и Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00 347 (эксперименты раздела № 4).

Financing. The study was financed by the grant No. 14-15-00 362 from the Russian Science Foundation (experiments in sections No. 1–3) and grant No. 16-04-00 347 from the Russian Foundation for Basic Research (experiments in section No. 4).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005;330(7503):1304–5.
2. Shcherbakov A.M., Andreeva O.E., Shatskaya V.A., Krasil'nikov M.A. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2012;113(6):2147–55.
3. Viedma-Rodríguez R., Baiza-Gutman L., Salamanca-Gómez F. et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep* 2014;32(1):3–15.
4. Nalvarte I., Schwend T., Gustafsson J.A. Proteomics analysis of the estrogen receptor alpha receptosome. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(7):1411–22.
5. Bihani T., Ezell S.A., Ladd B. et al. Resistance to everolimus driven by epigenetic regulation of MYC in ER+ breast cancers. *Oncotarget* 2015;6(4):2407–20.
6. Oliveras-Ferreras C., Vazquez-Martin A., Cuyàs E. et al. Acquired resistance to metformin in breast cancer cells triggers transcriptome reprogramming toward a degradome-related metastatic stem-like profile. *Cell Cycle* 2014;13(7):1132–44.
7. Shcherbakov A.M., Sorokin D.V., Tatarskiy V.V. Jr et al. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB Life* 2016;68(4):281–92.
8. Семина С.Е., Багров Д.В., Красильников М.А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):50–5. [Semina S.E., Bagrov D.V., Krasil'nikov M.A. Intercellular interactions and progression of hormonal resistance of breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(2):50–5. (In Russ.)].
9. Reid G., Hübner M.R., Métivier R. et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11(3):695–707.
10. Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006. Chapter 3: Unit 3.22.
11. Yang B., Wang S., Yu S. et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein 3 inhibits oxidative stress during intracerebral hemorrhage via PKA signaling. *Brain Res* 2017;1657:176–84.
12. Choi J., Kim D.I., Kim J. et al. Hornerin is involved in breast cancer progression. *J Breast Cancer* 2016;19(2):142–7.
13. Wang Z.C., E D., Batu D.L. et al. 2D-DIGE proteomic analysis of changes in estrogen/progesterone-induced rat breast hyperplasia upon treatment with the Mongolian remedy RuXian-I. *Molecules* 2011;16(4):3048–65.
14. Queiroz E.A., Puukila S., Eichler R. et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 2014;9(5):e98207.

Эритроцитарный диагностикум для выявления опухолевого процесса

Л.А. Савлучинская¹, И.А. Бакулин², А.А. Молодык¹

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

²компания «Б-Фарм»; Россия, 121309 Москва, ул. Баркляя, 13

Контакты: Людмила Александровна Савлучинская blood-research@yandex.ru

Предложен метод создания эритроцитарного диагностикума, в основе которого лежат данные патента №2452501 (от 10.06.2012) по способу получения сенситина из сыворотки жеребых кобыл, для использования этого фактора в качестве биомаркера для диагностики злокачественных новообразований. В целях выявления практической значимости предложенного диагностикума представлены результаты тестирования сыворотки крови 215 больных с опухолями различных локализаций и 67 лиц без злокачественных новообразований. Проведена оценка полученных результатов по общепринятым критериям для диагностических наборов. При этом чувствительность метода составила 88 %, специфичность – 89 %, точность – 89 %. Доступность и простота постановки реакции, а также быстрота получения ответа позволяют применять данный метод в условиях любого лечебного учреждения индивидуально или в процессе скрининга в целях определения предварительного диагноза, а также в мониторинге процесса лечения больного и раннем выявлении рецидива заболевания.

Ключевые слова: онкологическое заболевание, ранняя диагностика, сыворотка жеребых кобыл, эмбриоспецифический антиген, сывороточный фактор, первичный скрининг

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-99-103

Erythrocyte diagnosticum as used in revealing malignant process

L.A. Savluchinskaya¹, I.A. Bakulin², A.A. Molodyk¹

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

²Company "B-Pharm"; 13 Barklaya St., Moscow 121309, Russia

A method is proposed for the development of an erythrocyte diagnosticum based on the evidence of patent № 2452501 (10.06.2012) via development of sensitine obtained from the serum of mares in foal, the above factor being used for diagnosis of malignant neoplasms. In order to reveal the practical significance of the diagnosticum proposed the findings of the testing of the blood serum of 215 patients with variously located tumors and from 67 individuals without malignant tumors are analyzed. Sensitivity of the method was 88 %, specificity – 89 %, accuracy – 89 %. The accessibility of the method proposed and simplicity of the reaction as well as the rapid response make it possible to use the method under discussion in any medical institution individually or in the course of screening to obtain primary diagnosis or to reveal risk groups.

Key words: cancer, early diagnostic, serum of mares in foal, embryospecific antigen, serum factor, initial screening

Введение

Предложен метод, в основе которого лежат данные о способе получения из сыворотки жеребых кобыл соединения, проявляющего стимулирующую активность в отношении злокачественных клеток, и использования его в качестве маркера для сенсбилизации эритроцитов в диагностическом тесте в целях выявления опухолевого процесса [1]. Авторы исходили из широко известного факта антигенного соответствия между эмбриональными, малигнизированными и регенерирующими тканями: при неопластической трансформации обнаруживаются антигены, характерные для ранних этапов развития зародыша (эмбриональные или стадио-

специфические антигены) [2]. При развитии зародыша и процесса регенерации ткани это лишь кратковременный этап, который сменяется дальнейшими стадиями роста и дифференцировки [3]. Появление же эмбриональных антигенов в опухоли представляет собой процесс блокировки нормальной клеточной дифференцировки, что стабилизирует процессы пролиферации [2]. Выявление эмбриональных антигенов в биологических жидкостях или тканях организма делает их значимыми маркерами опухолевого процесса [4, 5]. Необходимо отметить, что перекрестные реакции эмбриональных антигенов наблюдаются независимо от видовой при-

надлежасти клеток, именно поэтому один из первых опухолеассоциированных антигенов — альфа-фетопро-теин — изначально идентифицирован в сыворотке кро-ви эмбриона мыши и в крысиных и мышинных гепато-мах, затем он был обнаружен при первичном раке печени человека. Выявлено большое количество опу-холеассоциированных антигенов, на основании кото-рых разработаны иммунодиагностические тесты, од-нако разница в содержании этих антигенов в опухолях и нормальных тканях носят не абсолютный, а количе-ственный характер [5]. Кроме того, считается, что один маркер не может обеспечить высокую точность диаг-ностики из-за гетерогенности опухоли и распростра-ненности воспалительных и доброкачественных за-болеваний [6]. В настоящее время используют мультимолекулярные тесты, результаты которых пока-зали значительное увеличение специфичности и прог-ностической ценности по сравнению с использо-ванием одного маркера [7]. Однако такой подход в диагностике не всегда и не везде доступен, поэтому поиск новых маркеров продолжается [8, 9]. Источником искомого нами специфического фактора, указываю-щего на наличие опухолевого процесса, служила сыво-ротка жеребых кобыл на ранних стадиях беременности.

Материалы и методы

В нашей работе для получения сенситина исполь-зовали сыворотку жеребых кобыл на 50–70-е дни бе-ременности. Фракционирование данной сыворотки проводили методом жидкостной хроматографии. Пос-ле пробных хроматографий с сефадексами G-50 и G-100 для дальнейшей работы выбран сефадекс G-50 с фосфатно-солевым буфером. Низкомолекулярные фракции в диапазоне 3000–15000 КД лиофилизиро-ваны для проверки пролиферативной активности в МТТ-тесте с культурами опухолевых клеток (кишеч-ника, яичников, молочной железы). Для пригото-вления эритроцитарного диагностикума фракциониро-вание проводили несколько раз в целях получения достаточного количества вещества.

Методика приготовления диагностикума. Формали-низированные эритроциты барана были отмыты физ-раствором и буфером, обработаны таннином, затем 4 % суспензия эритроцитов сенсibilизирована полученны-ми белковыми фракциями. Приготовлено несколько партий сенсibilизированных эритроцитов для отбора наиболее информативных в реакции с сыворотками больных и пациентов без онкологических заболеваний. Предварительный отбор и дальнейшее исследование по выявлению опухолевого процесса выполнялись на CELLSTAR 96 well cell Culture Plate V bottom.

Постановка реакции. Каждый ряд плашки (8 лунок) занимает одна тестируемая сыворотка, фактор разведе-ния, начиная со 2-й лунки — 1:2. Последовательные тестовые образцы имеют уменьшающуюся в 2 раза концентрацию сыворотки крови (от 1/20 до 1/2560). Затем в каждую лунку добавляют суспензию сенсibil-

лизированных эритроцитов и оставляют на 3–4 ч для проявления реакции агглютинации. Сенситин, сенсibilизированный на эритроцитах, реагирует с фактором, являющимся посредником или самим белком, вызывающим реакцию пролиферации. Если его количество велико, то реакция агглютинации про-исходит при высоких разведениях сыворотки, если нет — эритроциты оседают в первых лунках, так как их ничто не связывает. Чтобы определить «шкалу», т. е. разведения сыворотки, вызывающие реакцию аг-глютинации, мы провели предварительное тестирова-ние сыворотки 10 здоровых лиц и 10 больных с опухо-лями (рак толстой кишки, яичников, легкого). Наличие опухолевого процесса определяется при ре-акции агглютинации, соответствующей разведению сыворотки не менее 1:320 (разведение 1:160 можно считать пограничным).

Специфичность, чувствительность и точность ме-тода определяли по общепринятым формулам. Чувст-вительность рассчитывается как

$$a / (a + b) \times 100,$$

где a — положительный ответ в группе больных, b — отрицательный ответ в этой группе. Специфичность

$$c / (c + d) \times 100,$$

где c — отрицательный ответ в группе здоровых лиц, d — положительный ответ в этой группе. Точность

$$(a + c) / (a + b + c + d) \times 100.$$

Результаты

В целях подтверждения возможности использова-ния диагностикума для обнаружения опухолевого про-цесса нами протестированы сыворотки крови 215 пер-вичных больных с подозрением на наличие злокачественного процесса. В дальнейшем при клини-ческом обследовании этих пациентов диагноз был подтвержден. В качестве контроля протестированы образцы сыворотки крови пациентов без выявленных злокачественных новообразований. Полученные дан-ные представлены в табл. 1.

Таким образом, с учетом положительных и отри-цательных ответов точность метода составила 89 %.

Данные клинически установленных гистологиче-ских типов опухолей у тестируемых больных и наличие отрицательного ответа в сыворотке крови у этой груп-пы приведены в табл. 2.

Мы проанализировали полученные результаты в зависимости от гистологического типа опухолей. Интересно, что в группе больных раком яичников при гистологическом диагнозе эндометриозной аденокарциномы положительный ответ отмечен у всех 18 пациентов, в то время как при серозном раке у 2 из 8 больных реакция оказалась отрицатель-ной (75 % выявлений). Из 9 больных с диагнозом пигментной эпителиоциточной меланомы отрица-тельный ответ получен у 1 пациента (89 % выявле-ний), из 6 больных беспигментной меланомой — у 2 (67 % выявлений).

Таблица 1. Результаты тестирования сыворотки крови онкологических больных и здоровых лиц

Диагноз	Число пациентов	Положительный ответ	Отрицательный ответ	Процент выявления опухолей
<i>Онкологические больные</i>				
Рак мочевого пузыря	15	12	3	80
Рак матки	28	26	2	90
Рак молочной железы	30	27	3	90
Меланома	15	12	3	80
Рак желудка	18	17	1	94
Рак толстой кишки	34	31	3	81
Рак легкого	30	26	4	85
Рак яичников	26	24	2	90
Рак поджелудочной железы	19	16	3	84
<i>Всего</i>	<i>215</i>	<i>191</i>	<i>24</i>	<i>88</i>
<i>Здоровые лица (специфичность – 89 %)</i>				
Онкологические заболевания не выявлены	67	7 (у 2 из них пограничный процесс)	60	–

Таблица 2. Клинически установленные гистологические типы опухолей у больных и наличие отрицательного ответа в сыворотке крови у этой группы пациентов

Диагноз	Гистологический тип опухоли	Число пациентов	Отрицательный ответ
Рак мочевого пузыря	Переходно-клеточный рак	12	3
	Аденокарцинома	3	0
Рак матки	Железистосолитарный рак	16	0
	Высокодифференцированный железистый рак	12	2
Рак молочной железы	Инфильтративный протоковый рак	10	0
	Инфильтративный дольковый рак	20	3
Меланома	Пигментная эпителиоцелочная	9	1
	Беспигментная	6	2
Рак желудка	Высокодифференцированная аденокарцинома	11	1
	Умеренно-дифференцированная аденокарцинома	7	0
Рак толстой кишки	Высокодифференцированная аденокарцинома	27	3
	Низкодифференцированная аденокарцинома	7	0
Рак легкого	Плоскоклеточный рак	17	2
	Аденокарцинома	11	2
	Мелкоклеточный рак	2	0
Рак яичников	Эндометриозная аденокарцинома	18	0
	Серозный рак	8	2
Рак поджелудочной железы	Высокодифференцированная аденокарцинома	14	2
	Нейроэндокринный рак	5	1

Следует отметить, что при раке легкого, молочной железы и толстой кишки четкой зависимости между выявлением и гистологическим типом опухоли не зафиксировано. Также мы не обнаружили зависимости в отношении опухолей различной степени дифференцировки. Так, при раке толстой кишки высокодифференцированная аденокарцинома диагностирована у 27 больных (отрицательных — 3; 89 % выявлений), низкодифференцированная аденокарцинома — у 7 (отрицательных — 0). Ввиду небольших выборок эти факты требуют дальнейшего исследования, особенно в отношении рака яичников и меланомы.

Заключение

В последние годы внимание исследователей привлечено к изучению ауто-/паракринных факторов роста, их рецепторов и некоторых нижележащих сигнальных белков, а также к выявлению их роли в качестве ауто-/паракринного регулятора в развитии и течении злокачественных опухолей [10, 11]. Считается, что в основе способности опухоли к неограниченному автономному росту лежат эффекты факторов роста, продуцируемых различными компонентами тканей, взаимодействующих со специфическими трансмембранными рецепторами и связывающие эти факторы белками крови (так называемая сигнальная система), стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление. К настоящему времени выявлено несколько десятков различных факторов роста. Система реализации эффектов факторов роста включает рецепторы и связывающие белки, которые образуют сложно регулирующую сеть взаимодействия как между собой, так и с другими биологическими регуляторами роста и выживания клеток. Противоречивость и неоднозначность результатов

исследования роли компонентов сигнальных систем в патогенезе опухолей человека отражают сложность взаимоотношений между механизмами регуляции нормального роста клеток и канцерогенеза.

Наиболее изученными и клинически реализованными являются сигнальная система с участием рецептора эпидермального фактора роста и родственных ему рецепторов, а также сигнальная система инсулиноподобных факторов роста 1 и 2 их трансмембранные рецепторы и связывающие факторы роста белки. В целом анализ экспрессии рецепторов факторов роста, их лигандов, а также активности нижележащих сигнальных путей становится в настоящее время неотъемлемой составляющей комплексного обследования онкологического больного, необходимого для разработки и тактики лечения.

В нашей работе представлен эритроцитарный диагностикум, для приготовления которого использован сывороточный фактор (сенситин), выделенный из сыворотки жеребых кобыл на ранних стадиях беременности. Используемый нами сенситин, очевидно, можно отнести к ауто-/паракринным факторам роста. Положительный ответ, полученный у пациентов с наличием злокачественных опухолей, указывает на присутствие у этих больных компонентов сигнальной системы, стимулирующей развитие опухолевого процесса, но идентификация данного фактора роста и выявление компонентов сигнальной системы требуют дальнейших углубленных исследований.

Тестирование сыворотки крови 215 онкологических больных и 67 лиц с отсутствием злокачественных заболеваний, показавшее высокую точность (89 %) эритроцитарного диагностикума, а также доступность и простота метода позволяют рекомендовать его для использования в лечебных учреждениях в целях раннего обнаружения опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Патент РФ № 2452501 (дата публикации 10.06.2012). Патентообладатели: Балюра А.В., Молодык А.А., Савлучинская Л.А., Тарасов С.Г. [Patent of Russian Federation No. 2452501 (publication date 10.06.2012). Patentees: Balyura A.V., Molodyk A.A., Savluchinskaya L.A., Tarasov S.G. (In Russ.)].
2. Косяков П.Н., Косякова Н.П. Антигены опухолей человека. М.: Медицина, 1985. 270 с. [Kosyakov P.N., Kosyakova N.P. Antigens of human tumors. Moscow: Meditsina, 1985. 270 p. (In Russ.)].
3. Fiher B., Gunduz N., Coyle J. et al. Presence of growth stimulating factor in serum-following primary tumor removal in mice. *Cancer Res* 1989;49(8):1996–2001.
4. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Любимов Н.В. Биологические маркеры опухолей: методические аспекты и клиническое применение. Вестник Московского онкологического общества 2007;1. [Kushlinskiy N.E., Gershteyn E.S., Lyubimov N.V. Biological markers of tumors: methodical aspects and clinical application. *Vestnik Moskovskogo onkologicheskogo obshchestva = Bulletin of the Moscow Cancer Society* 2007;1. (In Russ.)].
5. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В. Серологические опухолевые маркеры. В кн.: Онкология. Национальное руководство. Под ред. В.И. Чисова, М.И. Давыдова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 8–26. [Sergeeva N.S., Marshutina N.V. Serological tumor markers. In book: *Oncology. National leadership*. Eds.: V.I. Chisov, M.I. Davydov. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. Pp. 8–26. (In Russ.)].
6. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):323–34.
7. Prior C.C., Guillen Grima F., Robles J.E. et al. Use of a combination of biomarkers in serum and urine to improve detection of prostatic cancer. *World Urol* 2010;28(6):681–6.
8. Mäbert K., Cojoc M., Peitzsch C. et al. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol* 2014;90(8):659–77.
9. Teng P.N., Bateman N.W., Hood B.L., Comads T.P. Advances in proximal fluid proteomics for disease biomarker discovery. *J Proteome Res* 2010;9(12):6091–100.
10. Доненко Ф.В., Кабиева А.О., Эфферт Т.Ф. Сывороточные опухолевые специфические факторы — необходимое условие роста опухоли в организме. Клиническая лабораторная диагностика 2013;(10):13–5. [Donenko F.V.,

Kabieva A.O., Effert T.F. Serum tumor-specific factors are a necessary condition for tumor growth in the body. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2013;(10):13–5. (In Russ.).

11. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):27–35. [Gershteyn E.S., Kushlinskiy N.E.

Growth factors, their receptors and downstream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):27–35. (In Russ.).

Нэйроэндокринные новообразования поджелудочной железы: новые аспекты морфологической классификации (Всемирная организация здравоохранения, 2017)

В.В. Делекторская

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

Контакты: Вера Владимировна Делекторская delektorskaya@yandex.ru

Четвертое издание классификации эндокринных опухолей Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), опубликованное в 2017 г., содержит существенные новые данные в разделе, посвященном панкреатическим нейроэндокринным новообразованиям (ПанНЭН). В данной редакции основные изменения базируются, главным образом, на новых молекулярных данных, а также на особенностях клинического поведения опухолей, выявленных за период, прошедший с момента выхода в 2010 г. классификации ВОЗ опухолей пищеварительной системы. В соответствии с новой классификационной схемой, представленной в разделе опухолей нейроэндокринной части панкреас, ПанНЭН включают злокачественные высокодифференцированные нейроэндокринные новообразования (НЭН), которые называются панкреатические нейроэндокринные опухоли (ПанНЭО), и низкодифференцированные НЭН, которые объединяет термин «панкреатический нейроэндокринный рак» (ПанНЭР). ПанНЭО далее разделяют с учетом пролиферативной активности на опухоли трех степеней злокачественности (Grade, G): G1 (<2 митозов на 10 HPF (high-power field, поле зрения при большом увеличении) и индекс Ki-67 <3 %), G2 (2–20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 3–20 %) и G3 (>20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 >20 %). Новая категория высокодифференцированных нейроэндокринных опухолей G3 в данной редакции классификации ВОЗ введена впервые. ПанНЭР классифицируют как новообразования G3 и далее подразделяют на мелко-клеточный и крупноклеточный рак. В настоящем обзоре мы остановимся на новых характеристиках ПанНЭН и рекомендованных изменениях, касающихся их терминологии и классификации.

Ключевые слова: поджелудочная железа, нейроэндокринный рак, новообразование, опухоль, рак, морфология, классификация, степень злокачественности, стадия

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-104-108

Pancreatic neuroendocrine tumors: new aspects of morphological classification (World Health Organization, 2017)

V.V. Delektorskaya

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

The fourth edition of the World Health Organization (WHO) classification of endocrine tumors published in 2017 contains substantial new findings in the topics of pancreatic neuroendocrine neoplasms (PanNENs). In this edition, major modifications are mainly based on new molecular knowledge as well as the clinical behaviour of these tumors accommodated since the previous 2010 classification of digestive tumors was published. According to the new classification scheme PanNENs include malignant well-differentiated neuroendocrine neoplasms (NENs), which are called pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs), and poorly differentiated NENs, which are called pancreatic neuroendocrine carcinomas (PanNECs). PanNENs further divided into three Grade (G) on the base of cell proliferation: G1 (<2 mitoses on 10 HPF (high-power field) and Ki-67 Index <3 %), G2 (2–20 mitoses on 10 HPF or Ki-67 Index 3–20 %), G3 (>20 mitoses on 10 HPF or Ki-67 Index >20 %). The new category NET G3 was first introduced in this edition of the WHO classification. PanNECs is classified as G3 neoplasms (>20 mitoses on 10 HPF or Ki-67 Index >20 %) and additionally divided into small cell NEC and large cell NEC. In this review we focus on some of the new features of PanNETs and recommended changes of their terminology and classification.

Key words: pancreas, neuroendocrine cancer, neoplasm, tumor, carcinoma, pathology, classification, grade, stage

Введение

Четвертая редакция классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) эндокринных опухолей, опубликованная в 2017 г., содержит ряд дополнений в подходах к диагностике нейроэндокринных новообразований (НЭН) поджелудочной

железы [1]. Основные изменения базируются, главным образом, на новых молекулярных данных, а также на особенностях клинического поведения опухолей, выявленных за период, прошедший с момента выхода в 2010 г. классификации ВОЗ опухолей пищеварительной системы, которая включала кри-

терии для диагностики НЭН поджелудочной железы [2].

Панкреатические НЭН (ПанНЭН) представляют собой гетерогенную группу эпителиальных злокачественных новообразований, которые развиваются из нейроэндокринных клеток поджелудочной железы (островков Лангерганса) [3, 4]. На их долю приходится примерно 2–5 % от числа опухолей поджелудочной железы, а частота развития составляет менее 1 случая на 100 тыс. населения в год. При этом распространенность данной группы опухолей поджелудочной железы значительно увеличивается в последние 4 десятилетия, наиболее вероятно, благодаря постоянному расширению диагностических возможностей. Опухоли не демонстрируют различий в частоте развития в зависимости от пола пациентов и наблюдаются в разном возрасте с пиком выявляемости в 30–60 лет.

ПанНЭН имеют выраженную нейроэндокринную дифференцировку, которая проявляется особенностями гистологической структуры и иммуногистохимической экспрессией синаптофизина, а также в большинстве случаев хромогранина А. Данная группа опухолей включает злокачественные высокодифференцированные НЭН, которые называются панкреатические нейроэндокринные опухоли (ПанНЭО) и низкодифференцированные НЭН, которые объединяет термин «панкреатический нейроэндокринный рак» (карцинома) (ПанНЭР).

ПанНЭО являются в основном медленно растущими новообразованиями с показателями общей 5-, 10- и 20-летней выживаемости 33, 17 и 10 % соответственно. Хирургическая резекция опухоли значительно улучшает эти показатели. Напротив, при агрессивном и быстро растущем ПанНЭР продолжительность жизни пациентов редко превышает 1 год. ПанНЭО подразделяются на функционирующие и нефункционирующие новообразования. Опухоли, ассоциированные с клиническими синдромами, вызванными аномальной продукцией гормонов, рассматривают как функционирующие (синдромальные) ПанНЭО. К ним относятся инсулиномы, гастриномы, глюкагономы, VIPомы и другие более редкие новообразования. Нефункционирующие (несиндромальные) ПанНЭО не ассоциированы с клиническими синдромами гормональной гиперпродукции, но могут секретировать пептидные гормоны или биогенные амины в количестве, недостаточном для того, чтобы вызвать соответствующие симптомы и паранеопластические синдромы. Опухоли, имеющие диаметр <5 мм, обычно являются нефункционирующими и обозначаются как нейроэндокринные микроаденомы. По последним данным, нефункционирующие ПанНЭО составляют >60 % от числа всех ПанНЭН.

В 10–20 % случаев высокодифференцированные ПанНЭО могут быть ассоциированы с генетически детерминированными наследственными синдромами, такими как множественная эндокринная неоплазия

1-го типа (multiple endocrine neoplasia type 1, MEN-1), синдром фон Гиппеля–Линдау (von Hippel–Lindau, VHL), нейрофиброматоз 1-го типа (neurofibromatosis type 1, NF-1), туберозный склероз, глюкагон-клеточная дисплазия и неоплазия.

Для ПанНЭО характерны специфические генетические нарушения, такие как мутации генов *MEN1*, *DAXX* и *ATRX*, а также генов сигнального пути mTOR *TSC2*, *PTEN* и *PIK3CA*. Генетические нарушения в ПанНЭР значительно отличаются от тех, которые наблюдаются в ПанНЭО, и представлены в основном мутациями генов, вовлеченных в клеточный цикл, таких как *TP53*, *RB1* и *CDKN2A (p16)*.

В классификацию ВОЗ (2017) включена новая информация в отношении основных категорий ПанНЭН, системы градации, а также стадирования этих опухолей.

Новые аспекты классификации нейроэндокринных новообразований поджелудочной железы (Всемирная организация здравоохранения, 2017)

Классификация ВОЗ (2010) опухолей пищеварительной системы разделяет НЭН желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы на 2 группы на основании морфологии и уровня пролиферации: панкреатические (1) высокодифференцированные НЭН, обозначаемые как нейроэндокринные опухоли (НЭО) и (2) низкодифференцированные НЭН, обозначаемые как нейроэндокринный рак (карцинома) (НЭР). ПанНЭО далее разделяли с учетом пролиферативной активности на НЭО Grade 1 (G1) (<2 митозов на 10 HPF (high-power field, поле зрения при большом увеличении) и индекс Ki-67 ≤2 %), либо НЭО Grade 2 (G2) (2–20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 3–20 %). ПанНЭР классифицировали как новообразования Grade 3 (G3) (>20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 >20 %) и далее подразделяли на мелкоклеточный или крупноклеточный рак.

Классификация ВОЗ (2010) являлась функциональной и эффективно стратифицировала выживаемость ПанНЭН, но за время, прошедшее с момента ее публикации, было обнаружено, что некоторые ПанНЭН, имеющие гистологические характеристики ПанНЭО, демонстрируют индекс пролиферативной активности Ki-67 >20 %. Наиболее часто это наблюдается в метастазах в печени, которые развиваются в процессе опухолевой прогрессии. В соответствии с критериями классификации ВОЗ (2010) подобные опухолевые очаги должны быть диагностированы как ПанНЭР. Однако, несмотря на то что прогноз этих опухолей, как оказалось, хуже, чем у НЭО G2, их биологическое поведение тем не менее является менее агрессивным по сравнению с ПанНЭР. Кроме того, эти новообразования демонстрируют признаки, ассоциированные с ПанНЭО (например, экспрессию гормонов и гормональные синдромы), и не имеют генетических аномалий, характерных для ПанНЭР (например, изменений

экспрессии и мутаций генов *TP53* и *RBI*). Более того, результаты исследований, посвященных изучению течения заболевания у пациентов с диагнозом ПанНЭР согласно критериям классификации ВОЗ (2010), показали, что при 1-й линии платиносодержащей химиотерапии, которая используется для лечения низкодифференцированных ПанНЭР, пациенты, имеющие новообразования с индексом Ki-67 <55 %, хуже отвечают на терапию, но имеют лучшую выживаемость, чем больные с индексом Ki-67 ≥55 %.

На основании представленных данных классификация ВОЗ (2017) опухолей эндокринных органов в главе, посвященной НЭН поджелудочной железы, представляет новую категорию опухолей – ПанНЭО G3.

Новое в подходах к оценке основных категорий и уровня пролиферативной активности ПанНЭН. Новая категория ПанНЭН – ПанНЭО G3 – это опухоли, которые сохраняют высокодифференцированную гистологическую модель строения, не демонстрируют выраженную иммуногистохимическую экспрессию p53 и потерю RB, но имеют индекс Ki-67 >20 %. Верхнего порогового уровня митотического индекса или индекса пролиферации Ki-67 для НЭО G3 не установлено, но значения этих показателей обычно составляют ≤20 митозов на 10 HPF и ≤55 % соответственно. ПанНЭО G3 могут содержать компонент низкой степени злокачественности или быть обнаружены как метастазы у пациентов, которые ранее имели ПанНЭО G1 или G2. ПанНЭР G3 сохраняет показатель нижнего порогового уровня индекса Ki-67, равный 20 %, но демонстрирует низкодифференцированное гистологическое строение (мелкоклеточного или крупноклеточного типа), а также часто экспрессирует p53 и теряет RB, кроме того, для него характерно отсутствие экспрессии ISL1 и сохранение экспрессии DAXX и ATRX.

В таблице представлены основные категории НЭН поджелудочной железы с учетом дифференцировки и степени злокачественности в соответствии с критериями классификации ВОЗ (2017).

Результаты исследований, проведенных на больших выборках пациентов, показали, что больные с диагнозом НЭО G1 и G2 имеют значительно более высокий риск прогрессирования заболевания, если в качестве порогового уровня индекса пролиферации Ki-67 используется показатель 5 % вместо 2 %. Однако пока не накопилось достаточно доказательств того, что данный более высокий пороговый уровень дает основание для изменения подходов к клиническому ведению пациентов, что не позволяет в настоящее время утвердить его новое значение.

Категория гиперпластических и пренеопластических поражений, включенная в классификацию ВОЗ (2010), была упразднена в новой, так как не были четко идентифицированы изменения, предшествующие ПанНЭН и ассоциированные со спорадическими новообразованиями. Эти изменения были четко описаны только в случаях MEN-1, синдрома VHL и глюкагон-клеточной дисплазии и неоплазии (ранее называемой глюкагон-клеточный аденоматоз).

Определение категории «панкреатическая нейроэндокринная опухоль (ПанНЭО)». Категория ПанНЭО – это высокодифференцированные НЭН низкой, промежуточной или высокой степени злокачественности, постороенные клетками с минимальной или умеренной атипией. Опухоли демонстрируют органоидную модель строения, отсутствие некрозов и экспрессируют общие маркеры нейроэндокринной дифференцировки (диффузно и интенсивно синаптофизин, а также обычно хромогранин А) и панкреатические или эктопические гормоны (обычно интенсивно, но

Классификация Всемирной организации здравоохранения (2017) и градация панкреатических нейроэндокринных новообразований (ПанНЭН) поджелудочной железы

Классификация/Grade	Индекс пролиферации Ki-67, %	Митотический индекс
Высоккодифференцированные ПанНЭН: панкреатические нейроэндокринные опухоли (ПанНЭО)		
ПанНЭО G1	<3	<2
ПанНЭО G2	3–20	2–20
ПанНЭО G3	>20	>20
Низкодифференцированные ПанНЭН: панкреатический нейроэндокринный рак (ПанНЭР)		
ПанНЭР G3	>20	>20
Мелкоклеточный тип		
Крупноклеточный тип		
Смешанные нейроэндокринные/ненейроэндокринные новообразования		

Примечание. Индекс пролиферации Ki-67 базируется на оценке ≥500 клеток в областях наиболее высокого ядерного мечения (hotspots). Митотический индекс – на оценке митозов в 50 полях зрения при большом увеличении (high-power fields, HPF; 0,2 мм²) в областях наибольшей плотности и выражается как митозы в 10 HPF (2 мм²). Grade определяется на основании наивысшего показателя. Для оценки индекса Ki-67 рекомендуется подсчет с использованием распечатанного изображения.

не всегда диффузно). На основании их пролиферативной активности ПанНЭО разграничивают по степени злокачественности как G1 (<2 митозов на 10 HPF и индекс Ki-67 <3 %), G2 (2–20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 3–20 %) и G3 (>20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 >20 %) (см. таблицу). В случаях наличия ассоциированного клинического гормонального синдрома ПанНЭО могут быть далее классифицированы как инсулинома, глюкагонома, соматостатинома, гастринома, VIPома, серотонинпродуцирующая опухоль (с карциноидным синдромом или без него), опухоль, продуцирующая адренокортикотропный гормон, и т. д.

Определение категории «панкреатический нейроэндокринный рак (ПанНЭР)». Категория ПанНЭР – это низкодифференцированные НЭН высокой степени злокачественности, построенные из атипичных мелких клеток или клеток промежуточного и крупного размера, которые экспрессируют общие маркеры нейроэндокринной дифференцировки (диффузно или слабо синаптофизин и слабо или фокально хромогранин А) и редко гормоны, но не демонстрируют экспрессию маркеров экзокринных гормонов (например, трипсина, химотрипсина и др.). С учетом уровня пролиферативной активности (>20 митозов на 10 HPF или индекс Ki-67 >20 %) их рассматривают как опухоли высокой степени злокачественности (G3), которые подразделяют на мелкоклеточный или крупноклеточный рак (см. таблицу).

Новое в терминологии смешанных новообразований. Другое изменение в 4-й редакции классификации ВОЗ (2017) относится к терминологии, которая используется для обозначения смешанных новообразований. Поскольку эти опухоли иногда бывают высокодифференцированными и могут содержать иной, чем аденокарцинома, ненейроэндокринный компонент, был введен термин «смешанное нейроэндокринное-нейроэндокринное новообразование», который заменил используемый ранее термин «смешанный аденонейроэндокринный рак».

Определение категории «смешанное нейроэндокринное-нейроэндокринное новообразование». К данной категории относятся смешанные новообразования с нейроэндокринным компонентом, комбинированным с ненейроэндокринным компонентом (часто с протоковой аденокарциномой или ацинарноклеточной карциномой). Обычно оба компонента имеют высокую степень злокачественности (G3), однако иногда один или оба компонента могут иметь низкую степень злокачественности (G1 или G2). Поэтому, когда в составе опухоли выявляются разные морфологические компоненты, для каждого должна быть определена степень злокачественности с использованием соответствующей системы градации. Для того чтобы классифицировать опухоль как смешанное нейроэндокринное-нейроэндокринное новообразование, каждый компонент должен составлять $\geq 30\%$ общей популяции опухолевых клеток. Нейроэндокринный рак

с отдельными разрозненными нейроэндокринными клетками, выявляемыми при иммуногистохимическом исследовании, не соответствует этому критерию. Присутствие фокальной нейроэндокринной дифференцировки (<30 %) может быть отмечено, но не должно влиять на выбор диагностической категории. Смешанные новообразования являются, скорее, абстрактной категорией, чем отдельной нозологической единицей и требуют определения индивидуальных диагнозов, обозначающих конкретные клеточные компоненты (например, смешанный ацинарный нейроэндокринный рак, смешанный протоковый нейроэндокринный рак, смешанный ацинарный протоковый нейроэндокринный рак).

Новое в стадировании ПанНЭН. Система TNM-стадирования ПанНЭО, представленная в классификации ВОЗ (2017), соответствует 8-й редакции руководства по определению стадий злокачественных опухолей Американского объединенного комитета по онкологии (American Joint Commission on Cancer, AJCC)/Международного противоракового союза (Union for International Cancer Control, UICC) и согласуется с классификацией TNM, разработанной Европейским обществом по изучению нейроэндокринных опухолей (European Neuroendocrine Tumor Society, ENETS) [5, 6]. TNM-классификация ПанНЭР соответствует критериям для стадирования протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [7].

Риск опухолевой прогрессии. Критерии, определяющие риск прогрессии ПанНЭН, включены в классификацию TNM и систему градации опухолей, которые представлены в новой редакции. Эти критерии имеют высокую надежность и статистическую значимость (особенно индекс пролиферации Ki-67) в плане предсказания прогноза течения конкретной опухоли. Однако для того чтобы определить исход заболевания, нередко требуется длительное клиническое наблюдение, особенно для ПанНЭО, так как метастазы могут появиться спустя много лет после резекции первичной опухоли. Прогностические иммуногистохимические маркеры, кроме Ki-67, представлены в научной литературе (например, CK19, KIT, CD99, CD44, RP, p27), однако их достоверность должна быть доказана в исследованиях, проведенных на больших выборках пациентов. Прогностические молекулярные маркеры для большинства ПанНЭН пока недоступны или находятся в процессе изучения.

Новые моменты морфологической классификации ВОЗ (2017):

- уточнена система градации ПанНЭО;
- введена новая категория НЭО G3;
- уточнены критерии для категорий НЭО/НЭР;
- введена категория «смешанное нейроэндокринное-нейроэндокринное новообразование» и уточнены ее диагностические критерии;

- обновлена классификация TNM (в соответствии с AJCC/UICC (2017) и ENETS).

Ключевые положения морфологического заключения (ВОЗ, 2017):

- диагноз ПанНЭН должен быть классифицирован как НЭО или НЭР на основании морфологического заключения и далее уточнен по степени злокачественности как G1, G2 или G3 в зависимости от уровня клеточной пролиферации;
- для резецированных образцов следует определять стадию TNM (по макроскопической оценке локализации, размеру опухоли и наличию метастазов);
- рекомендуется включать в заключение комментарии о возможном клиническом поведении опухоли;
- оценка эндокринной функциональной активности опухоли должна проводиться по специальному клиническому запросу.

Заключение

Таким образом, в обновленной классификации ВОЗ (2017) представлены и обсуждены характерные особенности различных категорий ПанНЭН, их пролиферативной активности и степени злокачественности, возможности использования биомаркеров, а также новые генетические нарушения и их потенциальная значимость для опухолей данного типа. Изменения в новой редакции включают: 1) новый подход к классификации ПанНЭН на основе системы градации; 2) изменение гистологической градации ПанНЭН с введением новой категории НЭО G3; 3) обновленную систему TNM-стадирования ПанНЭО; 4) новую терминологию и уточненные критерии для диагностики смешанных опухолей.

Представленные данные являются фундаментальным источником информации для патоморфологической классификации НЭН поджелудочной железы, а их практическое использование должно оставаться важным и необходимым условием правильного определения и построения морфологического диагноза.

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

1. Lloyd R.V., Osamura R.Y., Kloppel G., Rosai J. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th edn. Lyon: IARC Press, 2017.
2. Bosman F. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon: IARC Press, 2010.
3. Ohmoto A., Rokutan H., Yachida S. Pancreatic neuroendocrine neoplasms: basic biology, current treatment strategies and prospects for the future. *Int J Mol Sci* 2017;18(1):143.
4. Reid M.D., Balci S., Saka B., Adsay N.V. Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocr Pathol* 2014;25(1): 65–79.
5. Rindi G., Falconi M., Klersy C. et al. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *Nat'l Cancer Inst* 2012;16(104): 764–77.
6. Rindi G., Kloppel G., Alhman H. et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumours: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006;449(4):395–401.
7. Bergsland E.K., Woltering E.A., Rindi G. et al. Neuroendocrine tumors of the pancreas. In: American Joint Committee on Cancer (AJCC). 8th edn. *AJCC Cancer Staging Manual*. Chicago: Springer, 2017. Pp. 407–419.

Памяти Юрия Марковича Васильева

Российская наука понесла невосполнимую утрату – 30 июня 2017 г. ушел из жизни член-корреспондент Российской академии наук, профессор Юрий Маркович Васильев, выдающийся ученый с мировым именем, создатель школы клеточной биологии в России. Вся долгая научная жизнь Ю.М. Васильева была связана с Национальным медицинским исследовательским центром онкологии им. Н.Н. Блохина, в становлении фундаментальной науки которого он играл важнейшую роль.

Родился Юрий Маркович 26 ноября 1928 г. в Москве. В 1949 г. по окончании Первого Московского ордена Ленина медицинского института он поступил в аспирантуру в Институт экспериментальной патологии и терапии рака (предшественник НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) к Л.М. Шабаду, после окончания которой в 1952 г. был принят на работу.

Юрий Маркович чрезвычайно быстро зарекомендовал себя как блестящий ученый-онколог, в равной степени владеющий новыми экспериментальными подходами, обладающий широким кругозором, неординарным, пытливым умом и высочайшей трудоспособностью. Главным смыслом жизни Юрия Марковича была наука. В 1960 г. он создал лабораторию механизмов канцерогенеза, в 1962 г. защитил докторскую диссертацию и в 1963 г. получил звание профессора. С 1963 г. Ю.М. Васильев как профессор кафедры вирусологии



преподавал для студентов биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, руководил группой клеточных регуляций в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ М.В. Ломоносова. В 1990 г. Юрий Маркович был избран членом-корреспондентом РАН.

Руководимая им лаборатория в течение многих лет проводила исследования биологии опухолевой клетки, в частности изучение цитоскелетных механизмов регуляции взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом и друг с другом, а также нарушений этих механизмов при превращении нормальных клеток в опухолевые. Результаты этих исследований имели приоритетный характер и нашли отражение в научных

публикациях в самых престижных международных журналах. Ю.М. Васильев опубликовал более 300 научных работ, включая 2 монографии на английском и 4 монографии на русском языке. Его работа, посвященная определяющей роли системы микротрубочек в направленности клеточного движения, была признана Международным институтом научной информации «классической по цитированию» («citation classic»).

Юрий Маркович с бесконечным интересом и вниманием относился к научной молодежи, в качестве соросовского профессора читал лекции для одаренных школьников по всей стране. Ю.М. Васильев подготовил 13 докторов и 33 кандидатов наук. Ученики Юрия Марковича занимают лидирующие позиции в мировой науке, основали собственные лаборатории в США, Израиле, Сингапуре.

В течение многих лет он был членом редакционных коллегий международных журналов *International Journal of Cancer*, *Cancer Surveys*, *the Cancer Journal*, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *Differentiation*, *Cell Motility and Cytoskeleton* и ряда российских журналов. Ю.М. Васильев был членом Научного совета по злокачественным новообразованиям при РАН, членом Научного совета по клеточной биологии РАН.

Для тех, кто знал Юрия Марковича, он навсегда останется в памяти как величайший подвижник науки, блестящий ученый и любимый учитель.

Коллеги и ученики Ю.М. Васильева