

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

А.С. Макарова

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

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

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

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

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

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

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

A.S. Makarova

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

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

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

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

Введение

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

У пациентов на фоне хронических вирусных гепатитов или цирроза возникает 80–90 % ГК [5]. Основными причинами цирротического поражения печени, которое стимулирует гепатоканцерогенез, являются инфекции, вызванные вирусами гепатита В (HBV) или гепатита С (HCV), алкогольная болезнь печени [3]. Другие факторы риска развития ГК — неалкогольный стеатогепатит, стеатогепатоз и неалкогольная жировая болезнь печени, наследственный гемохроматоз, метаболический синдром, диабет, курение, наличие в пище афлатоксина B1 [6].

Гепатоканцерогенез обусловлен длительным воздействием факторов риска, нарушающих активность

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

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

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

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

Основные генетические нарушения при гепатоканцерогенезе

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Нарушения механизмов эпигенетической регуляции в гепатоцеллюлярной карциноме

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

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

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

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

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

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

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

Изменение экспрессии генов при гепатоканцерогенезе

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

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

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

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

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

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

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

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

Системно-биологический анализ транскриптомных изменений при гепатоканцерогенезе

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

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

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

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

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

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

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

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

Таргетная терапия гепатоцеллюлярной карциномы и иммунотерапия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Заключение

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

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

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

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