

Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике

Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Елена Сергеевна Герштейн esgershtein@gmail.com

В обзоре представлены основополагающие данные современной литературы и результаты собственных многолетних исследований роли ауто/паракринных факторов роста, их рецепторов и некоторых нижележащих сигнальных белков (PI3K, Akt, NF-κB) в клиническом течении, прогнозе и формировании гормональной и/или лекарственной чувствительности различных опухолей человека. Суммированы также данные о ключевых таргетных препаратах, направленных на подавление различных компонентов сигнальных путей факторов роста; критериях оценки индивидуальной чувствительности к этим препаратам, в том числе с использованием современных молекулярно-биологических технологий.

Ключевые слова: факторы роста, рецепторы эпидермального фактора роста, HER2/neu, PI3K, Akt, NF-κB, молекулярно-направленная (таргетная) терапия

Growth factors, their receptors and down-stream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice

E.S. Gershtein, N.E. Kushlinsky

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center",
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The basic contemporary data and the results of authors' long-term personal research devoted to the role of auto/paracrine growth factors, their receptors and some down-stream signaling proteins (PI3K, Akt, NF-κB) in clinical course, prognosis and development of hormonal and drug sensitivity of various human tumors are reviewed. The data on the key targeted drugs suppressing various growth factor signaling pathways components are summarized with special attention to the criteria of assessment of individual sensitivity to these drugs including those based on modern molecular biologic technologies.

Key words: growth factors, epidermal growth factor receptors, HER2/neu, PI3K, Akt, NF-κB, targeted therapy

Современный уровень знаний о молекулярных механизмах возникновения и развития опухолей, их чувствительности или резистентности к различным препаратам и воздействиям позволяет в определенных случаях осуществить переход от усредненных стандартных схем лечения к так называемой персонализированной медицине, т.е. назначению его в соответствии с индивидуальными особенностями больного и биологическими характеристиками опухоли. Тем не менее нерешенных вопросов в этой области гораздо больше, чем убедительных ответов, а перенос результатов экспериментальных исследований в клиническую практику требует большой осторожности и масштабных клиничко-лабораторных испытаний [1].

Рецепторы семейства c-erbB

Хорошо известно, что одной из фундаментальных особенностей злокачественных опухолей является способность к неограниченному автономному росту. В основе этого свойства лежат эффекты факторов роста — белков или полипептидов, продуцируемых опухолевыми клетками или другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиоцитами) и взаимо-

действующих со специфическими тирозинкиназными рецепторами на поверхности клеток-продуцентов или соседних клеток, стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление.

К настоящему времени известно уже несколько десятков различных факторов роста, но наиболее изученной и клинически реализованной является сигнальная система с участием рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР) и родственных ему рецепторов семейства c-erbB или HER (human epidermal growth factor receptor) [2, 3]. В это семейство входят четыре белка — продукта онкогенов группы c-erbB: собственно РЭФР (ErbB-1, HER1), а также ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) — сходные по структуре трансмембранные рецепторы, внутриклеточная часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Известно довольно много лигандов рецепторов семейства c-erbB, а наиболее известными из них являются эпидермальный и α-трансформирующий факторы роста, амфирегулин и cripo, взаимодействующие только с РЭФР, а также херегулины (неурегулины), взаимодействующие с ErbB-3 и ErbB-4 [4]. Ни одного лиганда, взаимодействующего с рецептором ErbB-2 (HER2/neu), до настоящего времени не обнаружено, что связано,

по-видимому, с дефектом лиганд-связывающего домена этого рецептора [5].

Классический РЭФР и анти-РЭФР препараты

Многими исследователями, в том числе и в нашей лаборатории, было показано, что наличие в опухоли классического РЭФР (HER1), в особенности в отсутствие рецепторов стероидных гормонов, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе рака молочной железы (РМЖ) даже на ранних стадиях и о резистентности к эндокринной терапии [1]. Тем не менее из-за неоднозначности результатов, полученных разными авторами, определение РЭФР в качестве маркера общего прогноза или гормоночувствительности РМЖ в рутинную клиническую практику не вошло.

Помимо РМЖ, РЭФР выявляются в опухолях самых разных локализаций. Так, в серии работ, проведенных радиолигандным методом с использованием ^{125}I -меченного ЭФР с последующим разделением на гидроксипатите, являвшимся международно принятым «золотым стандартом» определения РЭФР в мембранной фракции тканей, мы показали, что эти рецепторы присутствуют в 32–75 % злокачественных опухолей (табл. 1). Чаще всего они обнаруживались при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), для которого бы-

ло продемонстрировано также значительное снижение безрецидивной и общей выживаемости больных при уровне РЭФР > 20 фмоль/мг белка [3].

Эти данные приобрели новое практическое значение в последнее время, когда на стадию клинических испытаний, а затем и практического использования вышли препараты, специфически блокирующие активность РЭФР (табл. 2), – моноклональные антитела к рецептору (Эрбитукс®, Вектибикс®) [6, 7] и ингибиторы его внутренней тирозинкиназы – ИТК (Iressa®, Tarceva®, Tyverb® и др.), реализующей первый этап передачи митогенного сигнала [8–10].

Эти препараты уже рекомендованы для лечения НМРЛ [11], а также опухолей головы и шеи [12, 13], колоректального рака [14] и рака поджелудочной железы [15]. При первых клинических испытаниях оказалось, что далеко не все рецепторположительные опухоли чувствительны к анти-РЭФР направленным препаратам (в частности к ИТК), что вызвало определенное разочарование исследователей. Однако в дальнейшем выяснилось, что для проявления эффекта этих препаратов (в частности, ингибиторов тирозинкиназы при НМРЛ) необходимо наличие в опухоли делеционной мутации L858R в тирозинкиназном домене гена РЭФР. Такая мутация была выявлена примерно у 5 % курящих и у 40 % некурящих РЭФР+-больных НМРЛ, она также чаще выявлялась у женщин, чем у мужчин [16–18]. Позднее были выявлены дополнительные мутации гена РЭФР, способствующие проявлению активности ИТК [19–21]. Общим для значимых мутаций гена РЭФР является то, что они приводят к его конститутивной, не зависимой от связывания лиганда активации. В настоящее время тестирование мутационного статуса гена РЭФР у больных НМРЛ является обязательным при решении вопроса о назначении ИТК.

В то же время эффективное использование препаратов на основе моноклональных антител при колоректальном раке ограничено только теми опухолями, в которых отсутствуют специфические мутации в гене *KRAS*, кодирующем один из ключевых нижележащих сигнальных белков, т. к. только опухоли с диким типом

Таблица 1. Частота выявления рецепторов эпидермального фактора роста в мембранной фракции злокачественных опухолей человека

Локализация опухоли	Общее число больных	% РЭФР+ опухолей
РМЖ	291	38
Первичные опухоли костей	115	58
Рак эндометрия	58	32
Рак легкого	63	75
Рак яичников	52	54
Рак пищевода	19	63
Всего	598	47

Таблица 2. Препараты, направленно действующие на рецепторы семейства *c-erbB*

Препарат	Рецептор-мишень	Механизм действия	Год
Иресса (гефитиниб)	HER1 – РЭФР	Специфический низкомолекулярный ИТК	2003
Эрбитукс (цетуксимаб)	HER1 – РЭФР	мАТ к внеклеточному домену	2004
Тарцева (эрлотиниб)	HER1 – РЭФР	Специфический низкомолекулярный ИТК	2005
Омнитарг (пертузумаб)	HER2	мАТ – ингибитор димеризации (HDI)	2005
Тайверб (лапатиниб)	HER1 – HER2	Двойной ТК-ингибитор	2006
Вектибикс (панитумумаб)	HER1 – РЭФР	мАТ к лиганд-связывающему домену	2006–2008
Герцептин (трастузумаб)	HER2	мАТ к проксимальному внеклеточному домену	1998

этого гена чувствительны к препарату [22–24]. Известно уже около десятка различных мутаций *KRAS*, однако наиболее значимыми для ответа на анти-РЭФР препараты являются мутации в 12, 13 и 61-м кодонах, выявление которых стало обязательным при назначении соответствующего лечения. Ген *KRAS* мутирован примерно у 40 % больных колоректальным раком, но далеко не все больные с геном дикого типа чувствительны к моноклональным антителам к РЭФР, что может быть связано с изменениями (в т. ч. и мутационными) в других звеньях сигнальной цепи, например в нижележащем эффекторе *BRAF* [25]. В настоящее время становится обязательным также тестирование мутационного статуса гена *NRAS*.

**HER2/neu – одна из первых мишеней
успешной молекулярно-направленной
(таргетной) терапии**

Огромный прорыв в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста опухолей, произошел после появления препарата Герцептин, представляющего собой гуманизированные моноклональные антитела к рецептору 2-го типа (*HER2/neu*) – уникальному представителю семейства, который имеет дефект в лиганд-связывающем домене, не взаимодействует ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, но является тем не менее ключевым звеном передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы [26]. Ключевая роль *HER2/neu* объясняется тем, что основной особенностью всех трансмембранных рецепторных тирозинкиназ является необходимость димеризации после связывания активирующего лиганда для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов, при этом рецепторы семейства *ErbB* могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, а наиболее активными являются гетероструктуры с участием рецептора *HER2/neu*.

Блокирование *HER2/neu* может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависящих от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения [27]. Общепринятым методом оценки чувствительности к Герцептину является использование иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания опухолевых тканей на белок *HER2/neu* с последующей оценкой амплификации гена *c-erbB2* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в спорных случаях, когда ИГХ-метод не дает строго положительного или строго отрицательного ответа. Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в лечении больных РМЖ, позволяя обеспечить максимальную эффективность Герцептина и избежать неоправданных затрат и осложнений.

Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации гена *HER2/neu*, то, несмотря на гигантский материал (к настоящему времени в различных лабораториях мира обследовано уже несколько десятков тысяч больных РМЖ), единого мнения о прогностической ценности этого маркера до недавнего времени не было [28], однако с 2005 г. рекомендовано исследовать экспрессию (лучше – амплификацию) *HER2/neu* в числе других факторов для формирования групп риска среди больных с ранними стадиями [29]. Есть также данные о том, что опухоли с амплифицированным геном *HER2/neu* слабо реагируют на эндокринную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии, при этом считается, что больным с *HER2/neu*-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии.

Наличие у *HER-2/neu* как внутри-, так и внеклеточной части приводит к тому, что в процессе димеризации может происходить деградация молекулы рецептора и миграция его внешнего домена в межклеточную среду. Эта особенность легла в основу разработки иммуноферментных систем для определения растворимого *HER2/neu* в сыворотке или плазме крови. Уже опубликованы результаты, свидетельствующие о перспективности этого теста, в первую очередь для мониторинга эффективности лечения Герцептином [30, 31]. Тем не менее признается необходимость дальнейшего набора материала и выработки четких количественных критериев для реального использования сывороточных показателей.

В исследовании, проведенном на 59 первичных больных РМЖ I–III стадии, мы показали, что уровень растворимого *HER2/neu* в сыворотке крови больных с опухолями, характеризующимися высокой экспрессией этого белка (2+/3+ по данным ИГХ), достоверно выше, чем у больных с низкой экспрессией *HER2*, а после удаления первичной опухоли уровень *HER2/neu* в сыворотке крови большинства больных снижается [32]. Эти предварительные данные свидетельствуют о том, что показатели сыворотки крови в определенной степени отражают уровень экспрессии *HER2/neu* в первичной опухоли и их определение может стать достаточно адекватным неинвазивным методом мониторинга статуса *HER2/neu* как в до-, так и в послеоперационном периоде.

Многочисленные клинические испытания Герцептина в различных схемах лечения РМЖ показали его высокую эффективность у больных с высокой экспрессией белка и/или амплификацией гена *HER2/neu* в опухоли, однако оказалось, что существуют и пациенты, исходно резистентные к этому препарату, несмотря на положительный *HER2*-статус опухоли, а также достаточно часто и быстро (в течение 1 года) резистентность к Герцептину развивается в процессе лечения [33]. Все это стимулировало интерес к изучению механизма действия этого препарата и поиску возможных причин исходной и приобретенной резистентности.

PI3K/Akt/NF-κB-сигнальный путь и его роль в формировании лекарственной и гормональной резистентности опухолей

Процесс передачи сигнала большинства факторов роста в упрощенном виде можно представить как последовательное фосфорилирование или дефосфорилирование ряда трансмембранных и внутриклеточных белков, многие из которых сами обладают ферментативной активностью. Распространение сигнала происходит путем последовательных воздействий одного белка в цепочке на другой. Важнейшие внутриклеточные системы, участвующие в реализации эффектов различных факторов роста, — это сигнальный путь, включающий фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K) и ее нижележащий эффектор серин/треониновую протеинкиназу Akt, а также *gas-Raf*-сигнальный каскад, включающий систему митоген-активируемых протеинкиназ. Значительную роль в регуляции клеточной пролиферации и программируемой клеточной гибели (апоптоза) играет также ядерный транскрипционный фактор NF-κB, поскольку он регулирует экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы. В большинстве опухолевых клеток NF-κB постоянно активирован и находится в ядре. Эта активация защищает клетки от апоптоза, а также увеличивает их пролиферативную активность, инвазивный, метастатический и ангиогенный потенциал. По отношению к PI3K/Akt и *gas-Raf*-сигнальным каскадам NF-κB является нижележащим эффектором.

NF-κB — один из наиболее универсальных клеточных регуляторов, он играет важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, воспалительной и аутоиммунной реакциях, модулируя экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы [34]. NF-κB представляет собой гетеродимерный комплекс белков семейства Rel, которые в большинстве покоящихся клеток неактивны и находятся в цитоплазме в комплексе со специфическими ингибиторами — IκB. Идентифицировано пять белков семейства NF-κB, содержащих общий ДНК-связывающий домен: NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (NF-κBp65), RelB и c-Rel. Основной формой существования этих белков в большинстве типов клеток является гетеродимер p50/RelA (p65). ДНК-связывающая активность NF-κB стимулируется в ответ на целый ряд экзогенных стимулов, причем этот процесс не зависит от синтеза белка *de novo*. В большинстве нормальных клеток NF-κB/IκB комплексы находятся в цитоплазме в транскрипционно неактивном состоянии и активируются только при поступлении в клетку соответствующего регуляторного стимула. В этом случае происходит фосфорилирование ингибиторного белка IκB специфическими киназами (IKK) [35], а затем его убиквитинация и полная деградация в протеасомах, в результате чего свободный и активный NF-κB поступает в ядро.

Многоплановые и воспроизводимые экспериментальные исследования указывают на то, что конститутивная активация Akt и в целом PI3K/Akt сигнально-

го пути является одним из ключевых механизмов резистентности HER2-положительных клеток к Герцептину и другим препаратам, направленным против рецепторов семейства РЭФР, а также может рассматриваться в качестве одного из механизмов гормонорезистентности рецепторположительных опухолей. В последние годы также показано, что гиперактивация NF-κB является одной из причин резистентности РМЖ и некоторых других опухолей не только к антиэстрогенам, но и к химиопрепаратам и лучевой терапии. Другим клинически значимым эффектом NF-κB может оказаться его способность стимулировать образование остеолитических метастазов в костях.

Уровень и соотношение экспрессии и степени активации промитогенных и антиапоптотических сигнальных белков в опухолевой ткани может служить показателем пролиферативной активности опухоли и ее чувствительности или резистентности к различным видам терапии, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза при различных новообразованиях. Предполагается, что создание противоопухолевых агентов, блокирующих NF-κB и вышележащие сигнальные пути, позволит повысить чувствительность клеток к существующим видам терапии, а также может иметь самостоятельное терапевтическое значение. Однако большинство доказательств определяющего значения PI3K/Akt/NF-κB-сигнального пути получено в экспериментальных системах, а данные об экспрессии и активности этих белков в опухолях человека немногочисленны, получены различными методами и требуют дальнейшего подтверждения и развития. Кроме того, для эффективного использования подобных молекулярно-нацеленных препаратов в клинике необходимо выявить нозологические формы опухолей и группы больных, у которых можно ожидать наибольшего эффекта. Важным моментом является также соотношение содержания белка-мишени в опухоли и окружающей неизменной ткани.

Экспрессия PI3K/Akt/NF-κB в опухолях молочной железы

Мы провели два небольших исследования, в одном из которых методом иммуноблоттинга была оценена экспрессия регуляторной p85 субъединицы PI3K [36], а в другом — иммуноферментным методом оценена экспрессия активированной (фосфорилированной по Ser473) Akt1 [37, 38] в опухолях и прилежащих гистологически неизмененных тканях больных РМЖ. Оказалось, что активность этих двух компонентов одного сигнального каскада изменяется при малигнизации клеток молочной железы по-разному: в то время как экспрессия PI3K была увеличена в опухолях 79 % больных и не зависела от основных клиникo-морфологических факторов, включая статус рецепторов стероидных гормонов, Akt1 была активирована только в 49 % опухолей, и частота ее активации положительно коррелировала с их размером и степенью злокачественности, была выше в РЭ (рецептор-эстро-

генов) положительных РМЖ, чем в РЭ-отрицательных, а соотношение со статусом рецепторов прогестерона (РП) было противоположным. На основании этих результатов мы пришли к выводу о том, что, несмотря на кооперированную роль PI3K и Akt в регуляции роста и выживаемости клеток, их влияние на клиническое течение и гормональную или лекарственную чувствительность РМЖ может существенно различаться.

Эти исследования получили в настоящее время дальнейшее развитие с включением в спектр исследуемых маркеров ключевых субъединиц NF-κB (p65 и p50), одного из его ингибиторов IκBα и суммарной Akt1 [39, 40]. Определение экспрессии и активности сигнальных белков в ядерно-цитоплазматических экстрактах опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных РМЖ проводили с помощью различных иммуноферментных тест-систем.

Так, суммарное содержание NF-κBp65 определяли с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа «NF-κBp65 (Total)» (Invitrogen, США). ДНК-связывающую активность NF-κBp65 и NF-κBp50 измеряли, используя наборы «TransAM™ NFκB p65» и «TransAM™ NFκB p50» (Active Motif, США). Принцип этого метода количественного измерения ДНК-связывающей активности заключается в следующем: активированная (свободная) субъединица NF-κB специфически связывается с иммобилизованным на 96-луночной планшете олигонуклеотидом, содержащим консенсусную последовательность 5' – GGGACTTCC – 3', с которой активированный NF-κB взаимодействует в ядре при реализации своей транскрипционной активности, после чего проводится стандартное прямое иммуноферментное определение количества связавшегося белка с использованием специфических антител к p65 или p50. Для построения калибровочной кривой в обоих случаях использовали ядерный экстракт активированных клеток Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat, ДНК-свя-

зывающую активность которого принимали за 100 единиц (Ед). Определение суммарной и активированной (фосфорилированной) Akt1, а также суммарного и активированного (фосфорилированного) IκBα альфа (IκBa) проводили с помощью наборов для прямого иммуноферментного анализа компании Cell Signaling Technology (США): «PathScan™ Total Akt1 Sandwich ELISA Kit», «PathScan™ Phospho-Akt1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit», «PathScan™ Total IκBα Sandwich ELISA Kit» и «PathScan™ Phospho-IκBα (Ser32) Sandwich ELISA Kit».

Всего было обследовано 183 больных РМЖ в возрасте от 23 по 77 лет, проходивших лечение в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН в период с ноября 2008 по октябрь 2013 г. У всех больных диагноз РМЖ был поставлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования. Больные распределялись по стадиям заболевания следующим образом: у 24 % выявлена I, у 29,5 % – IIa, у 24,5 % – IIb, у 12,5 % – IIIa, у 4 % – IIb и у 5,5 % – IIIc стадия РМЖ. Количество исследований по каждому из маркеров представлено в табл. 3.

Во всех опухолях обнаружены измеримые количества NF-κBp65, Akt1 и IκBa (табл. 3). У 84 % больных РМЖ содержание NF-κBp65 в опухоли было достоверно выше, чем в окружающей неизмененной ткани; содержание Akt1 было повышено в 88 %, а содержание IκBa – в 95 % опухолей (во всех случаях $p < 0,0001$). ДНК-связывающая активность NF-κBp65 выявлена в 98 % опухолей и достоверно повышена по сравнению с окружающей тканью у 95 % больных ($p < 0,0001$). В 97 % опухолей выявлена также повышенная ДНК-связывающая активность NF-κBp50. Отмечена высоко достоверная положительная корреляция ДНК-связывающих активностей NF-κBp65 и p50 в опухоли ($R = 0,88$; $p < 0,0001$), при этом активность p50 превышала активность p65 в 10–570 раз (медиана – 77 раз). Эти показатели коррелировали также с содержанием IκBa и Akt1,

Таблица 3. Содержание и активность некоторых компонентов NF-κB-сигнального пути в ядерно-цитоплазматических экстрактах опухолей и окружающих гистологически неизмененных тканей больных РМЖ

Показатель	Число больных	РМЖ		Неизмененная ткань молочной железы	
		Диапазон	Медиана	Диапазон	Медиана
NF-κBp65 (нг/мг белка)	157	0–89,7	13,9 ¹	0–66,6	1,8
ДНК-связывающая активность NF-κBp65	99	0–711	193 ¹	0–143	28,7
ДНК-связывающая активность NF-κBp50	125	0–15030	3571 ¹	0–4694	466
IκBa	43	1,83–61,8	35,1 ¹	0–42,9	5,85
Phospho-IκBa	43	0–5,13	0,95	1,55–7,0	1,22
Akt1	43	2,60–82,5	42,8 ¹	2,77–67,4	16,1
Phospho-Akt1	91	0–57,0	9,1	0–49,4	12,8

¹ $p < 0,0001$ по отношению к показателям неизмененной молочной железы (тест Вилкоксона). Все показатели, кроме содержания и удельной ДНК-связывающей активности NF-κBp65 выражены в относительных единицах на 1 мг общего белка ядерно-цитоплазматического экстракта.

а активность NF-κBp50 — с содержанием phospho-Akt1, повышенным только в 37 % опухолей.

Достоверной взаимосвязи с такими клинико-морфологическими факторами, как стадия заболевания, размер (индекс Т), гистологическое строение и степень злокачественности РМЖ, степень поражения лимфатических узлов (индекс N), а также уровень экспрессии маркера пролиферации Ki67, ни для одного из исследованных показателей не обнаружено.

Учитывая роль активации Akt и NF-κB-сигнального пути в регуляции гормональной и лекарственной чувствительности РМЖ, особое внимание было уделено оценке взаимосвязи изучаемых показателей с рецепторным статусом опухоли. Достоверных различий в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu для большинства показателей не обнаружено, что может быть связано с преобладанием в обследованной группе РЭ+HER2— опухолей (78,5 %) и незначительным числом всех остальных подгрупп. Но можно отметить тенденцию к увеличению содержания и ДНК-связывающей активности NF-κBp65 и уровня phospho-Akt1 в РЭ— опухолях по сравнению с РЭ+. Наблюдали также достоверное увеличение содержания общего белка NF-κBp65 ($p < 0,01$) и снижение его удельной активности ($p < 0,05$) в HER2+ опухолях по сравнению с HER2—.

Таким образом, по данным нашего исследования, более чем в 90 % опухолей больных РМЖ координированно увеличивается ДНК-связывающая активность NF-κBp50 и p65, а также содержание NF-κBp65, IkBa и протеинкиназы Akt1. Удельная ДНК-связывающая активность NF-κBp65 наиболее высока в опухолях с «тройным отрицательным» рецепторным статусом (РЭ—РП—HER2—), не поддающихся ни эндокринной, ни молекулярно-направленной терапии, поэтому именно эта подгруппа больных РМЖ может получить преимущество от использования селективных ингибиторов NF-κB.

Клиническое значение исследования PI3K/Akt/NF-κB и некоторых других сигнальных белков в опухолях человека

Ранее [41] уже была продемонстрирована возможность стратификации РЭ+ больных РМЖ на чувствительных и резистентных к тамоксифену, основываясь на показателях ДНК-связывающей активности NF-κB. Кроме того, прогностическое значение активированного NF-κB у РЭ+ больных РМЖ с метастазами в лимфатических узлах продемонстрировали также С. Liu et al. [42], используя иммуногистохимический метод оценки экспрессии данного белка. При обследовании 130 больных ими обнаружено достоверное уменьшение безрецидивной и общей выживаемости при высокой экспрессии активированного NF-κB в опухоли, подтвержденное данными многофакторного анализа. Одновременно была исследована экспрессия других сигнальных белков: phospho-Akt, фосфорилированного транскрипционного фактора STAT3, РЭФР,

HER2/neu, фосфатазы PTEN, белка Ki67. Продemonстрирована положительная корреляционная взаимосвязь между уровнями экспрессии NF-κB и phospho-Akt. Оба эти показателя, в свою очередь, коррелировали с гиперэкспрессией HER2/neu и степенью злокачественности РМЖ. На основании этих результатов авторы предположили, что активация phospho-Akt/NF-κB сигнального пути ухудшает прогноз РЭ+ РМЖ с метастазами в лимфатических узлах.

На основании сравнения показателей в опухолевой и гистологически неизменной ткани нам удалось рассчитать пороговые значения, превышение которых соответствует неблагоприятному прогнозу РМЖ: NF-κBp65 > 30,2 нг/мг белка, ДНК-связывающая активность NF-κBp65 > 118 Ед/мг белка, ДНК-связывающая активность NF-κBp50 > 2300 Ед/мг белка, Akt1 > 48,4 Ед/мг белка. К сожалению, недостаточно продолжительный период наблюдения за нашими проспективно обследованными больными не позволяет пока ни подтвердить, ни опровергнуть практическую значимость этих критериев.

Для phospho-Akt1 неблагоприятным признано повышение ее уровня в опухоли по сравнению с неизменной тканью. Проследив в течение около 10 лет судьбу 33 больных РМЖ, у которых ранее было определено содержание данного маркера в опухоли и гистологически неизменной ткани, мы действительно, выявили тенденцию к снижению безрецидивной выживаемости в группе больных РМЖ с повышенным уровнем phospho-Akt1 в опухоли по сравнению с пациентами, у которых уровень phospho-Akt1 в опухоли был ниже, чем в окружающей ткани. Взаимосвязи общей выживаемости с увеличением phospho-Akt1 в опухоли по сравнению с нормальной тканью не выявлено. Продemonстрирована также тенденция к увеличению общей 9-летней выживаемости в группе больных, у которых уровень phospho-Akt1 в опухоли не превышает медианы.

Наиболее перспективными в настоящее время представляются комплексные исследования с использованием современных высокотехнологичных методов, позволяющих одновременно оценивать достаточно большой спектр взаимосвязанных и взаиморегулируемых показателей. Уже опубликованы результаты двух подобных исследований. Так, в работе [43] был использован метод микрочипов для определения уровня экспрессии комплекса генов, регулируемых NF-κB и транскрипционным фактором AP-1. Обследовано 4 группы больных РМЖ без метастазов в лимфатических узлах с РЭ+ опухолями (всего 262 пациентки), лечившихся в разных медицинских центрах и получавших адъювантно тамоксифен в различных режимах. Выявлено три NF-κB/AP-1 активируемых гена — циклин D1, uPA и VEGF, с помощью которых можно разделить больных РЭ+ РМЖ без метастазов в лимфатических узлах на подгруппы с более ранним и более поздним прогрессированием на фоне тамоксифена,

независимо от режима приема препарата. Наиболее значимыми различия были в группе молодых больных. Таким образом, оценка экспрессии этих генов, наряду с оценкой уровня активации самих транскрипционных факторов, может оказаться полезной для выявления группы больных, резистентных к тамоксифену, несмотря на положительный рецепторный статус опухоли.

Сравнивая активность NF-κB-сигнального пути в отечно-инфильтративном и типичном РМЖ с помощью определения «генных подписей» опухолей методом количественной полимеразной цепной реакции, S.J. Van Laere et al. [44] изучали несколько «подписей»: набор генов, характеризующих активность РЭ, набор генов, характеризующих активность МАП-киназного сигнального пути, группу из 8 генов, активируемых NF-κB, а также смешанную «подпись», объединяющую РЭ и NF-κB-регулируемые гены. Оказалось, что экспрессия большинства РЭ-модулируемых генов значительно увеличена в опухолях с транскрипционно неактивированным NF-κB. Более того, наблюдали отрицательную корреляцию между уровнями экспрессии РЭ-активируемых и NF-κB-активируемых генов, что подтверждает обратное соотношение между активностью РЭ и NF-κB-сигнальных путей. Отечно-инфильтративные раки характеризовались низкой экспрессией РЭ-зависимых генов и высокой экспрессией NF-κB-активируемых генов. В опухолях с таким фенотипом (как инфильтративных, так и неинфильтративных) выявлена также гиперэкспрессия РЭФР и/или HER2. Авторы полагают, что именно повышен-

ная экспрессия этих рецепторных белков приводит к активации NF-κB и подавлению активности РЭ.

Таким образом, результаты собственного исследования экспрессии и активности ключевых субъединиц ядерного транскрипционного фактора NF-κB, его ингибитора IκBα и вышележащей эффекторной протеинкиназы Akt1 в опухолях больных РМЖ, а также анализ современных публикаций, посвященных роли NF-κB и связанных с ним сигнальных белков в формировании гормональной и лекарственной резистентности РМЖ, свидетельствуют о перспективности использования этих показателей для выявления гормонорезистентной подгруппы среди больных рецепторположительным РМЖ. Дальнейшего клинического изучения требует вопрос о роли этих показателей в оценке и преодолении химио- и радиорезистентности РМЖ, а также в определении показаний к клиническому применению модуляторов активности NF-κB и общем прогнозе заболевания.

Возможные подходы к преодолению NF-κB-опосредованной резистентности к противоопухолевой терапии суммированы в нескольких обзорах [45–48]. В настоящее время известно несколько десятков экзогенных и эндогенных агентов, способных подавить активность NF-κB. Основным недостатком большинства из них является низкая специфичность. Некоторые из блокаторов NF-κB-сигнального пути обозначены на схеме (рис. 1), предложенной Y. Zhou et al. [48]. К числу наиболее перспективных и специфичных препаратов относятся ингибитор протеасом бортезомиб,

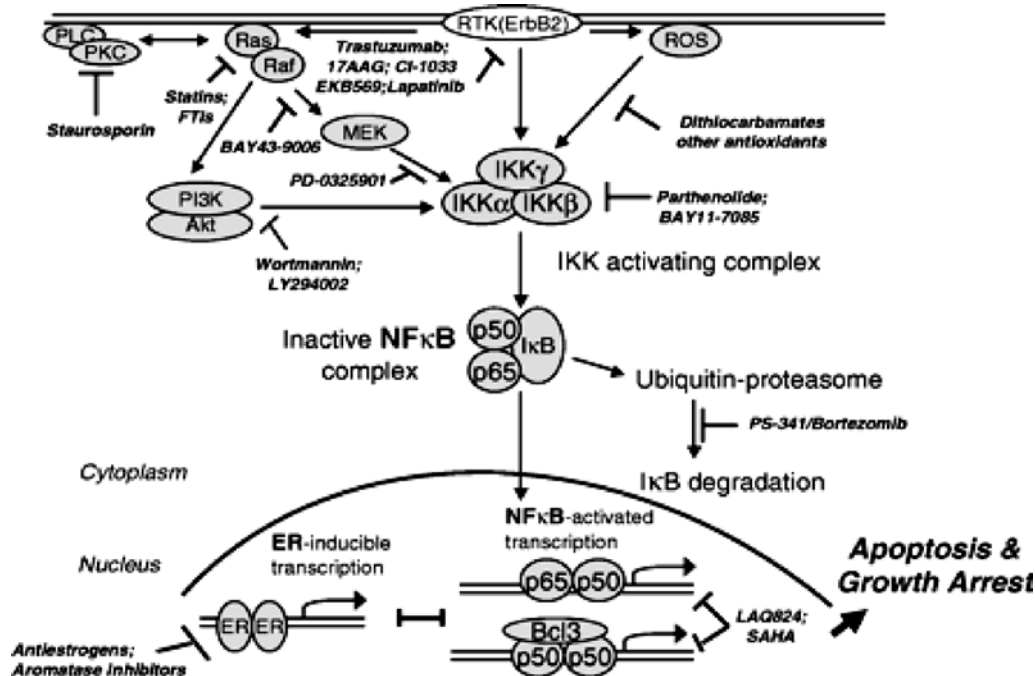


Рис. 1. Схема внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к активации NF-κB, влияющих на выживание и пролиферацию опухолевых клеток и приводящих к развитию гормонорезистентности. На схеме указаны также некоторые агенты, специфически ингибирующие эти сигнальные процессы и способные противодействовать вмешательству NF-κB в РЭ-зависимые эффекты таких препаратов, как антиэстрогены или ингибиторы ароматазы (цит. по [48])

который уже используется в лечении множественной миеломы [49], и ингибитор IκB-активирующей киназы партенолид [50, 51], обладающие значительной специфичностью по отношению к NF-κB и подавляющие его активацию, предотвращая деградацию IαB (бортезомиб) или подавляя его активацию (партенолид).

Интересно, что среди всех возможных ингибиторов сигнальных белков первым в клиническую практику вошел препарат Эверолимус (Афинитор), направленный против одного из компонентов PI3K/Akt-сигнального пути — киназы mTOR (mammalian target of rapamycin — мишень рапамицина у млекопитающих). mTOR занимает одну из ключевых позиций в данном сигнальном пути, являясь одновременно и вышележащим, и нижележащим эффектором Akt [52]. Афинитор представляет собой низкомолекулярный гетероциклический ингибитор mTOR и рекомендован к использованию в качестве препарата второй или третьей линии при некоторых нейроэндокринных опухолях, распространенном почечно-клеточном раке, а также при рас-

пространном РЭ+РП+HER2— РМЖ, резистентном к стандартным видам терапии, у женщин в постменопаузе [53, 54].

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 стратегии и тактики лечения и выбора наиболее эффективных схем лекарственной терапии. Все более значимое место в этом обследовании занимают молекулярно-генетические исследования. Однако, несмотря на огромные успехи последних лет, нерешенных вопросов в данной области все еще намного больше, чем достижений. Все это и определяет важность углубленного изучения механизмов передачи сигналов факторов роста и роли отдельных компонентов различных сигнальных каскадов для эффективного использования уже существующих и разработки новых молекулярно-направленных противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К. и др. Молекулярные маркеры опухолей. Бюлл эксп биол мед 2009;147(8):199–208.
- Herbst R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(2 Suppl):21–6.
- Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., Давыдов М.И. Рецепторы семейства c-erbB как мишени молекулярно-направленной противоопухолевой терапии: достижения, проблемы, перспективы. Молекулярная медицина 2010;(4):5–10.
- Montero J.C., Rodriguez-Barrueco R., Ocana A. et al. Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(11):3237–41.
- Ross J.S., Gray G.S. Targeted therapy for cancer: the HER-2/neu and Herceptin story. *Clin Leadersh Manag Rev* 2003;17(6):333–40.
- Friedlander E., Barok M., Szollosi J. et al. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol Lett* 2008;116(2):126–40.
- Chua Y.J., Cunningham D. Panitumumab. *Drugs Today (Barc)* 2006;42(11):711–9.
- Gialeli C., Kletsas D., Mavroudis D. et al. Targeting epidermal growth factor receptor in solid tumors: critical evaluation of the biological importance of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Med Chem* 2009;16(29):3797–804.
- Harari P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(4):689–708.
- Bose P., Ozer H. Neratinib: an oral, irreversible dual EGFR/HER2 inhibitor for breast and non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(11):1735–51.
- Tiseo M., Loprevite M., Ardizzoni A. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new prospective in the treatment of lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004;4(2):139–48.
- Astsuturov I., Cohen R.B., Harari P.M. EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6(8):691–710.
- Brockstein B., Lacouture M., Agulnik M. The role of inhibitors of the epidermal growth factor in management of head and neck cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2008;6(7):696–706.
- Burnett B. Clinical use of monoclonal antibodies to the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 2007;21(8):964–70; discussion 970, 974, 976–967.
- Modjtahedi H., Essapen S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities. *Anticancer Drugs* 2009;20(10):851–5.
- Gerber D.E. EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res* 2008;69(6):359–72.
- Chu E. Molecular biomarker development for anti-EGFR therapy: moving beyond EGFR expression. *Clin Colorectal Cancer* 2008;7(3):162.
- Pesek M., Benesova L., Belsanova B. et al. Dominance of EGFR and insignificant KRAS mutations in prediction of tyrosine-kinase therapy for NSCLC patients stratified by tumor subtype and smoking status. *Anticancer Res* 2009;29(7):2767–73.
- Zhao Z.R., Wang J.F., Lin Y.B. et al. Mutation abundance affects the efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitor readministration in non-small-cell lung cancer with acquired resistance. *Med Oncol* 2014;31(1):810.
- Antonicelli A., Cafarotti S., Indini A. et al. EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation. *Int J Med Sci* 2013;10(3):320–30.
- Al Dayel F. EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Infect Public Health* 2013;5 Suppl 1: S31–34.
- Plessec T.P., Hunt J.L. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* 2009;16(4):196–203.
- Neumann J., Wehweck L., Maatz S. et al. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Arch* 2013;463(4):509–23.
- Okada Y., Miyamoto H., Goji T. et al. Biomarkers for predicting the efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody in the treatment of colorectal cancer. *Digestion* 2014;89(1):18–23.
- Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., Nichelatti M. et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 2009;4(10):e7287.
- Miles D.W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. *Breast Cancer Res* 2001;3(6):380–4.

27. Brunelli M., Manfrin E., Martignoni G. et al. HER-2/neu assessment in breast cancer using the original FDA and new ASCO/CAP guideline recommendations: impact on selecting patients for herceptin therapy. *Am J Clin Pathol* 2008;129(6):907–11.
28. Duffy M.J. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* 2005;51(3):494–503.
29. Goldhirsch A., Glick J.H., Gelber R.D. et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16(10):1569–83.
30. Ardizzoni A., Cafferata M.A., Paganuzzi M. et al. Study of pretreatment serum levels of HER-2/neu oncoprotein as a prognostic and predictive factor in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2001;92(7):1896–904.
31. Carney W.P., Neumann R., Lipton A. et al. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem* 2003;49(10):1579–98.
32. Kushlinskii N.E., Shirokii V.P., Gershtein E.S. et al. Soluble fragment of HER2/neu receptor in the serum of patients with breast cancer with different levels of this protein expression in the tumor. *Bull Exp Biol Med* 2007;143(4):449–51.
33. Nahta R., Esteva F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 2006;232(2):123–38.
34. Biswas D.K., Shi Q., Baily S. et al. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(27):10137–42.
35. Adli M., Baldwin A.S. IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J Biol Chem* 2006;281(37):26976–84.
36. Scherbakov A.M., Gershtein E.S., Anurova O.A. et al. Activated protein kinase B in breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2005;139(5):608–10.
37. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Anurova O.A. et al. Phosphorylated Akt1 in human breast cancer measured by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay: Correlation with clinicopathological features and tumor VEGF-signaling system component levels. *Int J Biol Markers* 2006;21(1):12–9.
38. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Shatskaya V.A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinicopathological correlations. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1777–82.
39. Gershtein E.S., Platova A.M., Scherbakov A.M. et al. Comparative ELISA study of NF-kappaB p65 and p50, its inhibitor IkappaB, and upstream effector protein kinase Akt1 expression and activity in the tumors of breast cancer patients. *Tumor Biology* 2010;31(Suppl. 1):39–40.
40. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Platova A.M. et al. The expression and DNA-binding activity of NF-kB nuclear transcription factor in the tumors of patients with breast cancer. *Bull Exp Biol Med* 2010;150(1):71–4.
41. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Marx C. et al. Activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):1130–44.
42. Liu C., Zhou S., Ke C.S. et al. [Activation and prognostic significance of AKT, NF-kappaB and STAT3 in breast cancer with lymph node metastasis and estrogen receptor expression]. *Ai Zheng* 2007;26(9):929–36.
43. Zhou Y., Yau C., Gray J.W. et al. Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:59.
44. Van Laere S.J., Van der Auwera I., Van den Eynden G.G. et al. NF-kappaB activation in inflammatory breast cancer is associated with oestrogen receptor downregulation, secondary to EGFR and/or ErbB2 overexpression and MAPK hyperactivation. *Br J Cancer* 2007;97(5):659–69.
45. Wu J.T., Kral J.G. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 2005;123(1):158–69.
46. Rahman K.M., Ali S., Aboukameel A. et al. Inactivation of NF-kappaB by 3,3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6(10):2757–65.
47. Kim H.J., Hawke N., Baldwin A.S. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13(5):738–47.
48. Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Eppenberger U. et al. The NF-kappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12 Suppl 1:S37–46.
49. Cardoso F., Ross J.S., Picart M.J. et al. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004;5(2):148–57.
50. Pajak B., Gajkowska B., Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(2):129–35.
51. Jenkins C., Hewamana S., Gilkes A. et al. Nuclear factor-kappaB as a potential therapeutic target for the novel cytotoxic agent LC-1 in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2008;143(5):661–71.
52. Conde E., Angulo B., Tang M. et al. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res* 2006;12(3 Pt 1):710–7.
53. Widadkovich C., Dinh P., de Azambuja E. et al. HER-2 positive breast cancer: what else beyond trastuzumab-based therapy? *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(5):488–96.
54. Saunders P., Cisterne A., Weiss J. et al. The mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (everolimus) synergizes with chemotherapeutic agents, ionizing radiation and proteasome inhibitors in pre-B acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2010;96(1):69–77.