

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Изоформы актина
и неопластическая трансформация*

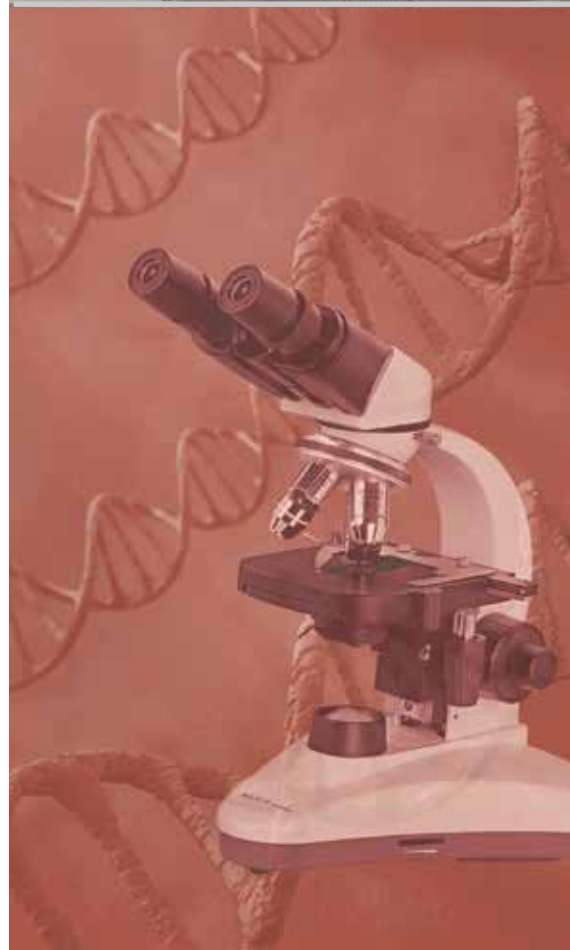
*Тимидинкиназа 1
как потенциальный
опухолеассоциированный маркер*

*Внутриопухолевая гетерогенность
и клональная эволюция рака
толстой кишки*

*Идентификация маркеров
аденокарциномы желудка на основе
биоинформатического анализа*

*Выявление мутаций в «горячих»
участках генома*

ТОМ 4 № 1
2017

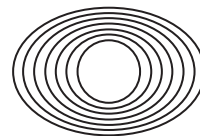


С 2014 г. журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

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

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



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

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ 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 «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

1 ТОМ 4
'17

Учредители:

ФГБУ «РОНЦ 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.Е. Ефремова**
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. № 1. 1–64

© 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 «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «НИИ 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 «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, руководитель отдела опухолевого роста ФГБУ «НИИ 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 «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ 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

Васильев Юрий Маркович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, вице-президент Общества клеточной биологии РАН (Москва, Россия)

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 «РОНЦ 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 «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

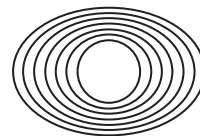
Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Since 2014, the journal "Advances in Molecular Oncology" 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 RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin Russian
Cancer Research Center,
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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2014

1 Vol. 4
'17

Founders:

N.N. Blokhin Russian Cancer
Research Center, 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.E. Efremova
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. 1. 1—64

© 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 Russian Cancer Research Center 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 Cancer Research Institute 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Cancer Research Institute 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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

Vasiliev Yuri M., PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Chief Researcher of Research Institute of Carcinogenesis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Vice President of the Cell Biology Society of the RAS (Moscow, Russia)

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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center 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 Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

<i>В.Б. Дугина, Г.С. Шагиева, Н.В. Хромова, П.Б. Копнин</i> Изоформы актина и неопластическая трансформация	8
<i>Н.С. Сергеева, Н.К. Парилова, Н.В. Маршутина, И.С. Мейснер</i> Тимидинкиназа 1 как потенциальный опухолеассоциированный маркер: структура, функции, активность в нормальных и опухолевых тканях	17
<i>М.Ю. Федянин, Х.Х.-М. Эльснукаева, С.А. Тюляндин</i> Внутриопухолевая гетерогенность и клональная эволюция рака толстой кишки	24
<i>Г.А. Раскин, А.К. Иванова, Р.В. Орлова</i> Клинико-морфологические особенности нейроэндокринных опухолей: опыт собственных исследований	35

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>В.В. Волкоморов, Е.С. Григорьева, Г.В. Краснов, Н.В. Литвяков, Н.А. Лисицын, М.И. Воевода, А.В. Белковец, С.Г. Афанасьев, Н.В. Чердынцева</i> Идентификация маркеров аденокарциномы желудка на основе биоинформатического поиска и анализа генной экспрессии	40
<i>В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн</i> Выявление мутаций в «горячих» участках генома: ампликоны-«шпильки» в методе плавления ДНК	46
<i>Д.В. Табаков, А.Н. Катаргин, А.М. Строганова, А.И. Сендерович, Д.Р. Насхлеташвили, Н.П. Киселева</i> Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена <i>MGMT</i> в глиомах	53
<i>А.М. Щербаков, Н.Э. Вавилов, О.Е. Андреева, <u>Б.В. Тяглов</u>, А.С. Миронов, Р.С. Шакулов, К.В. Лобанов, С.В. Яроцкий, А.А. Штиль</i> Действие акадезина на клетки рака молочной железы в условиях гипоксии	60

REVIEWS

<i>V.B. Dugina, G.S. Shagieva, N.V. Khromova, P.B. Kopnin</i>	
Actin isoforms and neoplastic transformation	8
<i>N.S. Sergeeva, N.K. Parilova, N.V. Marshutina, I.S. Meysner</i>	
The thymidine kinase-1 as a potential tumor marker: structure, function, activity in normal and malignant tissues	17
<i>M.Yu. Fedyanin, H.H.-M. Elsnukaeva, S.A. Tjulandin</i>	
Heterogeneity and clonal evolution of colorectal cancer	24
<i>G.A. Raskin, A.K. Ivanova, R.V. Orlova</i>	
Clinical and morphological characteristics of neuroendocrine tumors: clinical experience	35

EXPERIMENTAL REPORTS

<i>V.V. Volkomorov, E.S. Grigor'eva, G.S. Krasnov, N.V. Litvyakov, N.A. Lisitsyn, M.I. Voevoda, A.V. Belkovets, S.G. Afanas'ev, N.V. Cherdyntseva</i>	
Identification of the intestinal type gastric adenocarcinoma transcriptomic markers using bioinformatic and gene expression analysis	40
<i>V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, V.P. Shelepov, A.V. Lichtenstein</i>	
Detection of gene mutations in genome "hot" spots: "hairpin" amplicons in DNA melting analysis	46
<i>D.V. Tabakov, A.N. Katargin, A.M. Stroganova, A.I. Senderovich, D.R. Naskhletashvili, N.P. Kiseljova</i>	
Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes mutations and <i>MGMT</i> methylation in gliomas	53
<i>A.M. Scherbakov, N.E. Vavilov, O.E. Andreeva, B.V. Tyaglov, A.S. Mironov, R.S. Shakulov, K.V. Lobanov, S.V. Yarotskiy, A.A. Shtil'</i>	
Effect of acadesine on breast cancer cells under hypoxia	60

Изоформы актина и неопластическая трансформация

В.Б. Дугина¹, Г.С. Шагиева¹, Н.В. Хромова², П.Б. Копнин²

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

²Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Павел Борисович Копнин pbkopnin@mail.ru

Цитоплазматические изоформы актина (β и γ) играют важную роль в ключевых клеточных процессах, таких как адгезия, миграция, поляризация и цитокинез. Понимание специфических механизмов, лежащих в основе этих процессов, является связующим звеном между фундаментальными и клиническими исследованиями, так как модуляции актиновых изоформ прямо или косвенно связаны с различными патологиями. Исследованию функций цитоплазматических изоформ актина, связанных с подвижностью и делением нормальных и опухолевых клеток, адгезионными структурами, а также изучению соответствия их экспрессии и/или структурной организации нормальным и патологическим функциям клеток посвящен данный обзор. Селективная редукция β - или γ -цитоплазматических актинов позволила определить функциональные различия между этими изоформами. Преимущественную роль в сократительных и адгезионных активностях играет β -актин, тогда как цитоплазматический γ -актин участвует в образовании подмембранной сети, необходимой для клеточной пластичности и подвижности. Определяющую роль в установлении и поддержании нормальной архитектуры и динамики эпителиальных плотных и адгезионных межклеточных контактов играет связь с актиновым цитоскелетом. Продемонстрирована уникальная роль β - и γ -актинов в регуляции и поддержании целостности адгезионных и плотных межклеточных контактов соответственно. Похожие результаты были получены при сравнении опухолевых клеток с нормальными эпителиальными клетками в культуре и на срезах патологических тканей молочной железы, кишечника, легких и шейки матки человека. Изоформ-специфичная перестройка актинового цитоскелета и адгезионных межклеточных контактов является важным шагом в приобретении инвазивности эпителиальными опухолями.

Ключевые слова: цитоплазматическая изоформа актина, β -актин, γ -актин, неопластическая трансформация, опухолевая клетка, цитоскелет

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-08-16

Actin isoforms and neoplastic transformation

V.B. Dugina¹, G.S. Shagieva¹, N.V. Khromova², P.B. Kopnin²

¹A.N. Belozerskiy Research Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University; 1, Build. 40 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia;

²Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

The cytoplasmic actins (β and γ) play crucial roles during key cellular processes like adhesion, migration, polarization and cytokinesis. The understanding of their specific underlying mechanisms would be of major relevance not only for fundamental research but also for clinical applications, since modulations of actin isoforms are directly or indirectly correlated with severe pathologies. The major goal of the research was to elucidate the function of the actin isoforms during motile activities, adhesions and cell division and to investigate whether their expression and/or structural organization is related to pathological function. Selective depletion of β - and γ -cytoplasmic actins allowed attributing functional diversities of β - and γ -cytoplasmic actins. β -Cytoplasmic actin plays a preferential role in contractile activities, whereas γ -cytoplasmic actin mainly participates in the formation of a submembranous network necessary for cell shape flexibility and motile activity. The roles of isoforms in regulating the integrity of adherens and tight junctions respectively were demonstrated. Unique roles of β - and γ -cytoplasmic actins in normal cells were shown. Similar results were obtained in cancer cells compared with normal epithelial cells in culture and in human pathological tissue sections of mammary gland, colon, lung and cervix. Malignant cell transformation requires changes in the ability of cells to migrate. The disruption of actin cytoskeleton and intercellular adhesions is an important component of the acquisition of invasive properties in epithelial malignancies.

Key words: cytoplasmic actin isoform, β -actin, γ -actin, neoplastic transformation, tumor cell, cytoskeleton

Актин. Общие сведения

Эукариотические клетки содержат 3 различные цитоскелетные системы: актиновые микрофиламенты, микротрубочки и промежуточные филаменты. Они обладают совершенно разными свойствами: сборки,

архитектурной организации, динамическим поведением и механическими свойствами. Актин, который вовлечен во множество функций, является мажорным белком в разных типах клеток и высококонсервативен между видами. Самая высокая концентрация актина

(порядка 20 % от общего количества белка в клетке) обнаруживается в виде стабильной системы микрофиламентов, собранной в миофибриллы — сократимые структуры поперечнополосатых мышц. Помимо специализированной роли в мышечном сокращении, актин присутствует во всех клетках и выполняет разнообразные функции в зависимости от клеточного контекста. Актин играет важную роль в поддержании структуры клетки и отвечает за выполнение механических функций, обеспечивая внутриклеточную сократимость и/или натяжение, а также клеточную подвижность. Динамика актинового цитоскелета поддерживается 2 факторами: 1) способностью актина к обратимому переходу из мономерного (G-актина, глобулярного) в полимерное (F-актин, филаментозное) состояние; 2) взаимодействием актина с актин-связывающими белками (actin binding proteins, ABPs), которые могут ингибировать или стимулировать актиновую полимеризацию, разрезать полимеры, связывать актиновые филаменты в пучки или трехмерные сети из микрофиламентов и присоединять их к мембране клетки.

Для движения клетки, транспорта и многих других аспектов биологии клетки необходимы динамичное образование и разборка сетей актиновых филаментов, их прикрепление к клеточной мембране, молекулярным моторам и другим внутриклеточным структурам. Помимо сборки полимерных сетей, которые определяют механические свойства клеток, актиновые субъединицы и филаменты связываются с сотнями внутриклеточных лигандов и выполняют многие клеточные функции, некоторые из которых только начинают обнаруживаться. Изменения в организации микрофиламентов приводят к дезорганизации клеточной морфологии и ориентации, неконтролируемому клеточному росту и аномальному ответу на внеклеточное окружение.

Изоформы актина у высших позвоночных

У высших позвоночных идентифицировано 6 изоформ актина [1], первичная структура которых почти не меняется от птиц до человека [2]. У человека 6 генов актина локализованы на разных хромосомах [3]: α -скелетный (*ACTA1*) — на хромосоме 1; α -кардиальный, или сердечный (*ACTC1*), — на хромосоме 15; α -гладкомышечный (*ACTA2*) — на хромосоме 10; γ -гладкомышечный (*ACTG2*) — на хромосоме 2; β -цитоплазматический (*ACTB*) — на хромосоме 7; γ -цитоплазматический (*ACTG1*) — на хромосоме 17. Изоформы актина кодируются набором структурно родственных генов, которые происходят от общего предшественника и имеют высокоомологичные нуклеотидные последовательности [4]. Несмотря на некоторые отличия в первичной структуре, расположенные по всей молекуле, основные различия между изоформами сосредоточены на N-конце [1]. Эта вариабельность вносит вклад в различный общий заряд молекул, что может быть определено с помощью

изоэлектрофокусирования. В результате этого актины были классифицированы как α -, β - и γ -изоформы в порядке возрастания изоэлектрических точек (5,40; 5,42 и 5,44 соответственно) [5, 6]. Несмотря на сходные трехмерные структуры, несколько аминокислотных замен, распределенных в первую очередь в субдоменах 1 и 3, могут вызывать значительные изменения в конформации актина. Таким образом, изоформы могут отличаться как по общему положению малого домена относительно большого домена, так и по локальным конформациям на N-конце и, возможно, на C-конце [7]. N-концевой домен молекулы актина может участвовать во взаимодействиях с ABPs [8]. Известно о дифференцированном родстве изоформ актина к ABPs. В экспериментах *in vitro* показано селективное взаимодействие несаркомерных изоформ миозина с изоформами актина [9]. Выявлено преимущественное по сравнению с α -скелетным актином взаимодействие цитоплазматических изоформ актина с профилином [10, 11], тимозином $\beta 4$ [12], L-пластином [13], эзрином [14, 15], β CAP73 [16], дистрофином и утрофином [17]. При сравнении взаимодействия ABPs с β - или γ -актином обнаружено преимущественное связывание γ -актина с аннексином V [18]. Эти результаты предполагают, что в клетке, в которой одновременно экспрессируются разные изоформы актина, присутствие ABPs может приводить к образованию структур, селективно обогащенных одной из изоформ актина. После локальной трансляции изоформы актина могут быть изолированы внутри специфических цитоплазматических доменов изоформ-специфическими ABPs.

Неизменность аминокислотных последовательностей актинов свидетельствует о важной роли актина в первичных взаимодействиях, которые сохранились и поддерживались в эволюции и являются фундаментальными для клеточного выживания. В общем виде в норме во взрослом организме α -скелетный и α -сердечный актины ограничены скелетными и сердечными мышцами, а α - и γ -гладкомышечные актины экспрессируются в основном в гладких мышцах сосудов и кишечника. Цитоплазматические β - и γ -актины обнаружены во всех клетках. Эти изоформы актина экспрессируются в мышечных и немышечных клетках в соотношениях, регулируемых во времени и пространстве [5].

Специфические изоформы полимеризуются в различные филаментозные структуры, которые входят в состав разнообразных внутриклеточных структур, таких как миофибриллы, стресс-фибриллы, ламеллиподии или филоподии [19]. Структурно-функциональное разнообразие актиновых структур в немышечных клетках возможно благодаря специфическому взаимодействию изоформ актина, миозина и тропомиозина [20]. С помощью криоэлектронной микроскопии недавно получена структура комплекса актомиозин—тропомиозин с высоким разрешением для цитоплазматического

γ -актина, немышечных миозина 2C и тропомиозина 3.1 человека [21].

Регуляция экспрессии изоформ актина

Различия в экспрессии и распределении изоформ могут происходить на уровне генов (через различные промоторные элементы), и/или на уровне матричных РНК (мРНК) (через разные UTRs), и/или на уровне белка (через специфические взаимодействия с ABPs). мРНК изоформ актина отличаются между собой более значительно, чем кодируемые ими белки [19]. Во многих случаях 5'- и/или 3'-UTRs мРНК актиновых изоформ отличаются не только по последовательности, кодирующей белок. Эволюционная сохранность некоторых из изоформ-специфических UTRs означает, что они, по всей вероятности, обладают функциональной значимостью [22, 23]. Целый комплекс взаимодействующих между собой регуляторных элементов был обнаружен в промоторном районе актиновых генов. Отдельные сигнальные молекулы воздействуют на все изоактиновые гены, но существуют и другие, специфичные для каждой изоформы актина. Такие элементы избирательно модулируют экспрессию изоформ актина: напрямую или через взаимодействие с другими регуляторными элементами. Индукция экспрессии актинов сывороточными респонсивными факторами (serum response factor, SRF) представляет собой одну из наиболее интересных ситуаций [24]. Все промоторные области изоактинов содержат в своей последовательности несколько SRF-связывающих элементов, которые могут оказывать похожее действие на экспрессию изоформ актина [25]. Неполимеризованный актин (G-актин) может ингибировать экспрессию генов, связываясь с транскрипционными факторами MRTF-A (MAL) и MRTF-B. Повышение полимеризации актина (например, через RhoA-сигнальный путь) автоматически уменьшает цитоплазматический пул G-актина, вызывая высвобождение транскрипционных факторов и последовательную экспрессию генов-мишеней [25].

Механизм сортировки для изоформ актина может работать на уровне белка и/или на уровне мРНК [26, 27]. Асимметричный сортировка транскрипта β -актина достигается транспортом вдоль микротрубочек и актиновых филаментов [28, 29]. Локализация мРНК позволяет клеткам пространственно регулировать трансляцию и тем самым создавать функциональные компартменты с разными компонентами. Известно, что мРНК β -актина специфически локализована на ведущем крае фибробластов [30, 31]. Долгое время считалось, что локализация белка β -актина на ведущем крае клетки, где имеет место его полимеризация, зависит от локализации его мРНК [32]. Изучение механизма этого явления привело к пониманию того, что все мРНК содержат cis-элементы, чаще всего располагающиеся на 3'-UTR, с которыми связываются trans-факторы для определения их локализации. В фибробластах для подобной локализации мРНК β -актина достаточно

наличия коротких регуляторных фрагментов 3'-UTR. Один из таких фрагментов, 54-нуклеотидная последовательность, которая образует петлеобразную структуру, продемонстрировал наибольшую локализирующую активность и был назван zip-кодом мРНК β -актина. Локализирующие факторы, обладающие trans-действием (trans-факторы), которые связываются с zip-кодом β -актина, назвали zip-код-связывающими белками. Белок 68 кДа, который связывается с zip-кодом, был назван zip-код-связывающим белком 1 (ZBP1) [33]. Взаимодействие мРНК β -актина с ZBP1 необходимо для ее локализации в ламеллиподиях фибробластов, что играет определяющую роль в клеточной полярности и движении [29, 34], особенно для неметастазирующих клеток.

Для рака молочной железы человека и крысы показано, что низкий уровень ZBP1 коррелирует с инвазией и метастазированием опухолевых клеток [35]. Более того, ZBP1 был экзогенно экспрессирован в крысиной линии метастазирующей аденокарциномы молочной железы (MTLn3), в которой эндогенный уровень ZBP1 низок и мРНК β -актина деллокализована. Оказалось, что заново синтезированный актин вносит незначительный вклад во фракцию мономерного актина на ведущем крае [36]. Методом трекинга одиночных мРНК β -актина обнаружено, что ZBP1 транспортирует мРНК β -актина в места фокальных контактов, где он задерживается на некоторое время, приводя к стабилизации фокальных контактов и регулируя направленность движения фибробластов [37].

В качестве дополнения к транскрипционному и трансляционному контролю конкуренция между изоформами за включение в специфические структуры и разное сродство к ABPs могут определять внутриклеточную локализацию изоформ актина. Поскольку распределение изоформ актина часто отличается от распределения соответствующих мРНК [38], изоформ-специфический сортировка мРНК скорее определяет сайты синтеза и сборки, чем локализацию актиновых изоформ в клетке [39].

По одной из гипотез, в качестве главного механизма регуляции сегрегации изоформ актина было предложено аргинилирование. Данная посттрансляционная модификация актиновых изоформ должна происходить в результате экспозиции N-конца молекулы как потенциальной мишени для аргинилирования (Cys2/Asp3 в α -актинах, Asp2/Asp3 в β -актинах и Glu2/Glu3 в γ -актинах). Обнаружено, что β -, но не γ -актин, в иммортализованных SV-40 фибробластах подвержен N-концевому аргинилированию [40]. По мнению авторов, это индуцировало образование «слабой» β -актиновой сети на ведущем крае клетки [41]. По результатам масс-спектропии предполагалось, что этот тип модификации выявляется в 20–40 % молекул β -актина, но уровень модификации в различных типах клеток может быть и меньше. В противоположность этим предположениям, позднее было показано,

что аргинилирование может происходить на любом N-концевом остатке, включая многочисленные белки цитоскелета. Помимо актина, некоторые ABPs аргинилированы *in vivo*, в том числе Atp3, филамин, спектрин, немышечный миозин 1 и талин [42]. Аргинилирование Atp3, одного из компонентов комплекса, нуклеирующего актин (участвующего в полимеризации и ветвлении актиновых пучков) на ведущем крае клетки, может участвовать в формировании сети. Аргинилирование других белков, таких как филамин и спектрин, может менять организацию актина в цитоплазме [43]. Исследование F. Zhang и соавт., которое показало, что 2 цитоплазматические изоформы актина аргинилированы по-разному, никем в дальнейшем не подтверждено. Была проверена метаболическая устойчивость экзогенно экспрессированных аргинилированных и неаргинилированных изоформ актина [43]. В немышечных клетках аргинилированный γ -, но не β -актин, оказался нестабильным и легко деградировал. Нестабильность регулировалась различиями в кодирующих нуклеотидных последовательностях между 2 изоформами актина, которые обеспечивали разные скорости трансляции. Как следует из той же работы, аргинилированный β -актин действительно более стабилен, чем аргинилированный γ -актин, но остается менее стабильным, чем неаргинилированные изоформы.

Функции изоформ актина

Изоформы актина в основном тканеспецифичны. Их клеточные функции подтверждаются с помощью различных взаимодополняющих исследовательских подходов: 1) экспрессия изоформ актина в нормальных клетках и тканях в процессе развития организма и при различных патологических ситуациях; 2) мышечные модели (нокаутные и трансгенные), в которых изоформы избирательно удалены, экспериментально восстановлены или гиперэкспрессированы; 3) определение структурных и функциональных дефектов; 4) эффекты ингибирования экспрессии или организации изоформ в клетках методом малых интерферирующих РНК или ингибирующими пептидами.

Важным этапом в выяснении специфических биологических ролей актиновых изоформ было описание их тканевого распределения и внутриклеточной локализации. Получение специфических антител к изоформам позволило существенно продвинуться в изучении распределения и функций изоформ.

Цитоплазматические актины: внутриклеточная организация и функции

Цитоплазматические актины (β и γ) играют определяющие роли в таких ключевых процессах, как клеточная адгезия, миграция, поляризация и цитокинез. В большинстве немышечных клеток позвоночных около половины актинового пула присутствует в мономерном состоянии, что означает активную динамику полимеризации — деполимеризации. Немышечные клетки,

такие как эпителиальные, экспрессируют только β - и γ -актины в различных пропорциях [44]. β - и γ -актины отличаются только по 4 аминокислотным остаткам в положениях 1, 2, 3 и 9. По данным мутационных и нокаутных исследований на мышечных моделях, а также соответствующих патологий [45, 46], для многих мышечных изоформ предполагались специфические функции, однако о возможных специфических ролях β - и γ -актинов было известно мало. Гипоморфный аллель β -актина оказался летальным на эмбриональном уровне [47], а нокаутные по γ -актину мыши выживали [48]. Тем не менее у мышей без γ -актина наблюдались задержки эмбрионального развития, нарушения роста и выживаемости [49, 50].

Локализация белков β - и γ -актинов в различных внутриклеточных компартментах ранее была описана, но результаты довольно противоречивы, вероятно, из-за вариативности экспериментальных условий. Использование поликлональных антител к γ -СУА, не распознающих β -СУА, но реагирующих с гладкомышечными актинами, по-видимому, благодаря общей аминокислотной последовательности AcEEE на N-конце, усложняло интерпретацию результатов. Мезенхимальные клетки в культуре, например фибробласты, помимо цитоплазматических актинов экспрессируют α -гладкомышечный актин. Тщательно отобранные моноклональные антитела (mAbs), высокоспецифичные для γ -актина, т.е. не реагирующие с β -актином и гладкомышечными актинами, были использованы для изучения распределения цитоплазматических изоформ актина и функциональных исследований [51]. Несмотря на то что mAbs к β -актину существовали ранее, отсутствие специфических mAbs к γ -актину не давало возможности проводить сравнительное изучение распределения этих 2 изоформ в клетках. Отсутствие окрашивания β -актина в стресс-фибриллах ошибочно характеризовало эти структуры как образованные из γ -актиновых филаментов. Даже с подходящими антителами окраска отсутствовала, по-видимому, из-за недоступности эпитопа, так как для демаскировки N-концевой последовательности актина необходимы специфические условия фиксации [51, 52].

В основе способности клеток к делению, движению, генерации натяжения и сократимости и поддержанию формы лежат специализированные актин-содержащие структуры. С помощью высокоспецифичных моноклональных антител исследована внутриклеточная локализация цитоплазматических β - и γ -актинов в неподвижных (покоящихся) клетках и на различных моделях распластывания, миграции, деления и сократимости. Результаты получены с помощью одновременной специфической иммунодетекции β - и γ -актинов в одной и той же клетке. Впервые было продемонстрировано, что эти изоформы сегрегированы в цитоплазме мезенхимальных и эпителиальных клеток в состоянии покоя, а также при движении и делении

[51]. Для сравнительного исследования цитоплазматических изоформ актина были протестированы различные линии и первичные культуры клеток животных и человека. Особое внимание уделено линиям клеток нормального эпителия, так как в клетках этого типа экспрессируются только 2 изоформы актина, β и γ . Сегрегация изоформ наблюдалась во всех изученных типах нормальных немышечных клеток, что указывает на универсальность данного феномена.

Для исследования функциональных ролей β - и γ -актинов мы применяли метод малых интерферирующих РНК для избирательного уменьшения экспрессии изоформ. Селективное уменьшение экспрессии этих изоформ с помощью малых интерферирующих РНК показало, что каждая изоформа различным образом принимает участие в организации клеточной морфологии, полярности и подвижности.

Нами получены данные о сравнительной структуре и белковой композиции кортикальных и ламеллиподиальных γ -сетей, а также β -актиновых пучков и контактных структур в нормальных и неопластически трансформированных эпителиальных клетках [51, 53, 54]. Анализ трехмерной взаимной организации β - и γ -актинов в интерфазе и на разных стадиях митоза был проведен с использованием лазерной конфокальной микроскопии. Показано, что β -актин преимущественно локализован в филоподиях, стресс-фибриллах, кольцевых пучках и адгезионных межклеточных контактах, что означает роль этой изоформы в клеточной адгезии и сокращении [51, 54]. В зависимости от клеточной активности γ -актин организован по-разному. В движущихся клетках он представлен в виде кортикальных и ламеллиподиальных сетей, что предполагает его важную роль в клеточной подвижности. Сортинг β -актина в миозин-2-зависимые сократимые пучки (стресс-фибриллы, кольцевые пучки, сократимые кольца) показывает роль этой изоформы в клеточном сокращении. Еще одним аргументом в пользу роли β -актина в клеточной сократимости является четкая локализация этой изоформы в сократимом кольце при цитокинезе, в то время как γ -актин концентрируется в основном в субмембранном домене в течение всех митотических фаз. Наши данные об образовании большого количества многоядерных (в основном двуядерных) клеток в эпителиальных β -актин-дефицитных клетках полностью согласуются с данными об участии β -актина в образовании сократимого кольца при клеточном делении.

Обе изоформы локализованы в апикальной части поляризованных эпителиальных клеток в районе межклеточных контактов [51, 55], но регулируют разные адгезионные комплексы в эпителии: β -актин связан с адгезионными межклеточными контактами, а γ -актин — с плотными контактами [54]. Предварительные исследования организации и распределения β - и γ -изоформ актина в митотическом процессе [51, 56], а также в мейотических делениях клетки и ранних

эмбриональных делениях [57] выявили существенные морфофункциональные различия. Изменение функции γ -актина с помощью микроинъекции изоформ — специфических антител — показало, что γ -актин выполняет основную и специфическую функции в установлении и/или поддержании асимметрии в первом делении мейоза и поддержании кортикальной целостности. Возможно, различие в экспрессии γ -актина является одним из ранних маркеров, определяющих клеточную судьбу при эмбриональном развитии организма, а также при неопластической трансформации и прогрессии.

Реорганизация изоформ актина при неопластической трансформации

Понимание специфических функций изоформ актина представляет дополнительный фундаментальный материал для использования детекции этих белков в диагностике и лечении различных патологий, таких как фиброзы, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. При опухолевой трансформации происходит реорганизация актинового цитоскелета, ведущая к изменению клеточной подвижности, инвазии и метастазированию. Известно об изменениях экспрессии специфических мышечных изоформ актина при различных патологиях, таких как фиброматозы, гипертрофированные рубцы, стромальные реакции при неоплазиях и др. [45]. Данные об изменениях организации немышечного актина при опухолевой трансформации достаточно противоречивы, но в большинстве работ наблюдалась корреляция исчезновения пучков микрофиламентов с повышением миграционной активности или метастатического потенциала опухолевых клеток [58, 59]. Описано изменение специфических мышечных изоформ актина в некоторых опухолях. Получены данные об исчезновении α -гладкомышечного актина в спонтанно трансформированных клетках [60] при трансформации фибробластов опухолеродными вирусами и онкогенами в культуре (вирусом саркомы Рауса [61], аденовирусом 12-го типа, v-H-Ras) или уменьшении его экспрессии в трансформированных канцерогенами или вирусом SV40 низкотуморогенных клеточных линиях [62]. Те же авторы указывают на возможное изменение синтеза немышечных актинов при трансформации и супрессии β -актина в метастазирующих вариантах. Известно о мутациях в β -актиновом гене *ACTB*: G244D, вызывающей неопластическую трансформацию фибробластов человека [63, 64], и R28L, связанной со злокачественным прогрессированием клеток мышины меланомы [65]. Характер подвижности нормальных фибробластов и фибробластов, лишенных β -актина или, особенно, γ -актина, различается. Это свидетельствует о том, что изоформы актина играют разные роли в клеточной подвижности [51]. Следует отметить, что β - и γ -актины колокализованы в ламеллиподии, обе изоформы присутствуют в ламелле, но распределены в разных филаментных структурах. β -Актин локализован в пучках микрофиламентов,

концы которых соединены с фокальными контактами [51]. В нормальных фибробластах мРНК β -актина концентрируется во фронтальной части ламеллы, но заново синтезированный актин вносит незначительный вклад во фракцию мономерного актина на ведущем крае клетки [36]. Новым методом трекинга одиночных мРНК β -актина показано, что транспортировка этих мРНК в места фокальных контактов приводит к стабилизации контактных структур [37]. Эти результаты также согласуются с нашими данными о роли этой изоформы актина в клетке.

Ранее показано, что локализация мРНК β -актина на ведущем крае фибробластов, эндотелиальных клеток и миоцитов связана с направленным движением нормальных клеток, а делокализация — с потерей стабильной клеточной поляризации и направленного движения, что характерно для многих метастазирующих клеток [36]. Тем не менее той же группой R. H. Singer опубликованы данные о том, что взаимодействие ZBP1, необходимое для локализации мРНК β -актина на ведущем крае фибробластов, вызывает стабильный поляризованный фенотип у опухолевых клеток, но редуцирует их хемотактически зависимую подвижность, инвазивность и метастатический потенциал [66]. Частичная супрессия γ -актина в клетках SH-EP нейробластомы [67] с помощью малых интерферирующих РНК значительно угнетала миграцию в экспериментальную «рану» и через фильтры, а также происходили потеря поляризации и снижение скорости движения при одиночной миграции клеток. Более того, значительно возрастало количество фокальных контактов и их размеры, а также уменьшалось количество фосфорилированного паксиллина — маркера ранних инициальных контактов. Изменения цитоскелета сопровождалась активацией Rho-киназного сигнального пути [67]. В 2012 г. показано, что угнетение миграционного потенциала эмбриональных фибробластов с выключенным геном *ACTB* происходит из-за компенсаторной экспрессии α -гладкомышечного актина и повышенной сократимости таких клеток. Ингибирование повышенной сократимости восстанавливало миграционную способность фибробластов без β -, но с γ -актином [68]. Дальнейшее изучение фенотипических изменений клетки при опухолевой трансформации, а именно изменений распределения и экспрессии цитоплазматических изоформ актина, а также исследование регуляции β - и γ -актинов в нормальных и опухолевых клетках явились необходимыми для понимания функциональных ролей актиновых изоформ.

Другие данные о роли цитоплазматических актинов в клеточной миграции были получены в результате сравнительного изучения нормальных и неопластически трансформированных клеток. Обнаружено, что трансформированные клетки теряют β -актин-содержащие стресс-фибриллы, но в них выявляются хорошо развитые γ -актинсодержащие сети. Основное свойство клеточной трансформации состоит в реорганизации

актомиозинового цитоскелета, ведущей к повышенной клеточной подвижности и инвазии. Исчезновение актиновых стресс-фибрилл в трансформированных клетках продемонстрировано во многих работах [69–72].

Наши результаты показали, что при различных типах онкогенной трансформации происходит изменение специфической изоформы актина — β -актина [51, 53, 55, 73]. Более того, иммуноморфологическое исследование клинического материала подтверждает данные, полученные на клеточных культурах. Значительное уменьшение иммуногистохимической окраски на β -актин наблюдалось в клетках карцином молочной железы по сравнению с доброкачественными пролифератами [55]. Исключение составляли редкие формы инфильтративного рака молочной железы (так называемые базальноподобные), в которых содержание β -актина было снижено только в инвазирующих участках [74]. При иммуногистологическом исследовании образцов опухолевой ткани шейки матки также выявлено снижение окрашивания на β -актин в структурах рака *in situ* и инвазивного рака по сравнению с нормальной тканью экзоцервикса и интраэпителиальными неоплазиями [53]. Кроме того, методом белкового иммуоблоттинга обнаружены снижение экспрессии β -актина и повышение экспрессии γ -актина в трансформированных и опухолевых линиях эпителиальных клеток по сравнению с неопухолевыми. При эпителиально-мезенхимальном переходе в культурах клеток цервикальных карцином помимо изменений в распределении и экспрессии известных маркеров Snail, E- и N-кадгерина и виментина происходила реорганизация структур β -актина и изменение соотношения экспрессии цитоплазматических изоформ актина [53].

Фенотипическая нормализация трансформированных фибробластов и эпителиальных клеток под действием митохондриально-направленных антиоксидантов приводит к восстановлению β -актиновой системы пучков и сопряженных с ними фокальных контактов у фибробластов и адгезионных межклеточных контактов у эпителиальных клеток [73, 75].

Эксперименты по уменьшению экспрессии изоформ актина с помощью малых интерферирующих РНК, а также по экзогенной экспрессии цитоплазматических изоформ актина в опухолевых клетках (карциномах легкого и кишки) позволили выявить существенную функциональную разницу между изоформами. Уменьшение экспрессии β - или γ -актина с помощью малых интерферирующих РНК и экзогенная экспрессия актинов вызывали различные изменения морфологии, подвижности и пролиферации изучаемых культур. Сравнение инвазивных свойств клеток с измененными уровнями экспрессии β - и γ -актинов было проведено с использованием тестирования направленного движения в матрице. Также было проверено влияние изменения

соотношения изоформ на рост подкожных опухолевых ксенографтов. Функциональные данные подтвердили наши предположения о роли β -актина в поддержании нормального фенотипа и противоположной роли γ -актина в усилении неопластических свойств [76]. Реорганизация системы актиновых филаментов играет важную роль при неопластической трансформации клеток. Мы обнаружили, что изменение соотношения β - и γ -цитоплазматических актинов в клетках карцином легкого и толстой кишки человека: 1) характерно как для клеток, растущих *in vitro*, так и для тканевых опухолевых образцов; 2) напрямую связано с онкогенными свойствами и ростом опухолевых ксенографтов [76]. Повышение относительного уровня экспрессии β -актина ингибировало проявление онкогенного фенотипа и опухолевый рост, тогда как повышение экспрессии γ -актина усиливало онкогенный потенциал путем взаимодействия с регуляторными белками ERK1/2, p34-Arc, WAVE2, кофилином 1 и PP1. Положительная взаимозависимость экспрессии γ -актина и активации ERK1/2, наряду с преобладанием этой изоформы во всех исследованных опухолевых образцах, указывает на универсальный характер изменений

немышечных актинов при развитии некоторых часто встречающихся опухолей.

На различных клеточных культурах продемонстрировано, что модуляция экспрессии γ -актина приводит к похожим функциональным изменениям в нормальных и трансформированных клетках [51, 67, 76, 77]. Две цитоплазматические изоформы играют разные роли в неопластической трансформации. Недавно нами показано, что β -актин играет роль опухолевого супрессора, вызывая эпителиальную дифференцировку, торможение клеточного роста и инвазии в культурах клеток карциномы легкого и кишки, а также замедление опухолевого роста *in vivo*. Напротив, γ -актин связан с усилением неопластических свойств опухолевых клеток [76, 77].

Таким образом, результаты морфофункциональных исследований изоформ актина уже в настоящее время представляют возможность использования специфических моноклональных антител к β - и γ -изоформам актина, помимо широко применяемого в патологической морфологии α -гладкомышечного актина, в качестве дополнительных иммуногистологических маркеров в дифференциальной диагностике злокачественных новообразований.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00467).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vandekerckhove J., Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 1978;126(4):783–802. DOI: 10.1016/0022-2836(78)90020-7.
2. Kabsch W., Vandekerckhove J. Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:49–76. DOI: 10.1146/annurev.bb.21.060192.000405.
3. Gunning P., Ponte P., Kedes L. et al. Chromosomal location of the co-expressed human skeletal and cardiac actin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(6):1813–7.
4. Hightower R.C., Meagher R.B. The molecular evolution of actin. *Genetics* 1986;114:315–32.
5. Garrels J.I., Gibson W. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* 1976;9(4 Pt 2):793–805.
6. Rubenstein P.A. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 1990;12:309–15. DOI: 10.1002/bies.950120702.
7. Schutt C.E., Myslik J.C., Rozycki M.D. et al. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 1993;365(6449):810–6. DOI: 10.1038/365810a0.
8. Shterline P., Clayton J., Sparrow J. Actin. *Protein Profile* 1995;2(1):1–103.
9. Müller M., Diensthuber R.P., Chizhov I. et al. Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins. *PLoS One* 2013;8(7):e70636. DOI: 10.1371/journal.pone.0070636.
10. Larsson H., Lindberg U. The effect of divalent cations on the interaction between calf spleen profilin and different actins. *Biochim Biophys Acta* 1988;953(1):95–105.
11. Ohshima S., Abe H., Obinata T. Isolation of profilin from embryonic chicken skeletal muscle and evaluation of its interaction with different actin isoforms. *J Biochem* 1989;105(6):855–7.
12. Weber A., Nachmias V.T., Pennise C.R. et al. Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets. *Biochemistry* 1992;31(27):6179–85.
13. Namba Y., Ito M., Zu Y. et al. Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner. *J Biochem* 1992;112(4):503–7.
14. Shuster C.B., Herman I.M. Indirect association of ezrin with F-actin: isoform specificity and calcium sensitivity. *J Cell Biol* 1995;128(5):837–48.
15. Yao X., Cheng L., Forte J.G. Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. *J Biol Chem* 1996;271(12):7224–9.
16. Shuster C.B., Lin A.Y., Nayak R., Herman I.M. Beta cap73: a novel beta actin-specific binding protein. *Cell Motil Cytoskeleton* 1996;35(3):175–87. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:3<175::AID-CM1>3.0.CO;2-8.
17. Winder S.J., Hemmings L., Maciver S.K. et al. Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J Cell Sci* 1995;108(Pt 1):63–71.
18. Tzima E., Trotter P.J., Orchard M.A., Walker J.H. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* 2000;267(15):4720–30.
19. Gunning P., Weinberger R., Jeffrey P., Hardeman E. Isoform sorting and the creation of intracellular compartments. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:339–72. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.339.
20. Manstein D.J., Mulvihill D.P. Tropomyosin-mediated regulation of cytoplasmic myosins. *Traffic* 2016;17(8):872–7. DOI: 10.1111/tra.12399.
21. von der Ecken J., Heissler S.M., Pathan-Chhatbar S. et al. Cryo-EM structure of a human cytoplasmic actomyosin complex at near-atomic resolution. *Nature* 2016;534(7609):724–8. DOI: 10.1038/nature18295.
22. Gunning P., Mohun T., Ng S.Y. et al. Evolution of the human sarcomeric-actin

- genes: evidence for units of selection within the 3' untranslated regions of the mRNAs. *J Mol Evol* 1984;20(3–4): 202–14.
23. Yaffe D., Nudel U., Mayer Y., Neuman S. Highly conserved sequences in the 3' untranslated region of mRNAs coding for homologous proteins in distantly related species. *Nucleic Acids Res* 1985;13(10):3723–37.
 24. Treisman R., Alberts A.S., Sahai E. Regulation of SRF activity by Rho family GTPases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1998;63:643–51.
 25. Posern G., Treisman R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 2006;16(11):588–96. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.09.008.
 26. Singer R.H. The cytoskeleton and mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4(1):15–9.
 27. Gunning P., Hardeman E., Wade R. et al. Differential patterns of transcript accumulation during human myogenesis. *Mol Cell Biol* 1987;7(11):4100–14.
 28. Latham V.M., Kislauskis E.H., Singer R.H., Ross A.F. Beta-actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *J Cell Biol* 1994;126(5):1211–9.
 29. Oleynikov Y., Singer R.H. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 2003;13(3):199–207.
 30. Kislauskis E.H., Li Z., Singer R.H., Taneja K.L. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol* 1993;123(1):165–72.
 31. Lawrence J.B., Singer R.H. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* 1986;45: 407–15.
 32. Shestakova E.A., Singer R.H., Condeelis J. The physiological significance of beta-actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(13):7045–50. DOI: 10.1073/pnas.121146098.
 33. Ross A.F., Oleynikov Y., Kislauskis E.H. et al. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 1997;17(4):2158–65.
 34. Kislauskis E.H., Zhu X., Singer R.H. beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol* 1997;136(6): 1263–70.
 35. Wang W., Goswami S., Lapidus K. et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* 2004;64(23):8585–94. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1136.
 36. Condeelis J., Singer R.H. How and why does beta-actin mRNA target? *Biol cell* 2005;97(1):97–110. DOI: 10.1042/BC20040063.
 37. Katz Z.B., Wells A.L., Park H.Y. et al. β -Actin mRNA compartmentalization enhances focal adhesion stability and directs cell migration. *Genes Dev* 2012;26(17):1885–90. DOI: 10.1101/gad.190413.112.
 38. Hill M.A., Gunning P. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol* 1993;122(4):825–32.
 39. Hannan A.J., Gunning P., Jeffrey P.L., Weinberger R.P. Structural compartments within neurons: developmentally regulated organization of microfilament isoform mRNA and protein. *Mol Cell Neurosci* 1998;11(5–6):289–304. DOI: 10.1006/mcne.1998.0693.
 40. Karakozova M., Kozak M., Wong C.C. et al. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* 2006;313(5784):192–6. DOI: 10.1126/science.1129344.
 41. Kashina A.S. Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-terminus. *Trends Cell Biol* 2006;16(12):610–5. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.10.001.
 42. Wong C.C., Xu T., Rai R. et al. Global analysis of posttranslational protein arginylation. *PLoS Biol* 2007;5(10):e258. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050258.
 43. Zhang F., Saha S., Shabalina S.A., Kashina A. Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation. *Science* 2010;329(5998):1534–7. DOI: 10.1126/science.1191701.
 44. Otey C.A., Kalnoski M.H., Bulinski J.C. Identification and quantification of actin isoforms in vertebrate cells and tissues. *J Cell Biochem* 1987;34(2):113–24. DOI: 10.1002/jcb.240340205.
 45. Chaponnier C., Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* 2004;204(4):386–95. DOI: 10.1002/path.1635.
 46. Lambrechts A., Van Troys M., Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(10):1890–909. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.01.024.
 47. Shawlot W., Deng J.M., Fohn L.E., Behringer R.R. Restricted beta-galactosidase expression of a hygromycin-lacZ gene targeted to the beta-actin locus and embryonic lethality of beta-actin mutant mice. *Transgenic Res* 1998;7(2):95–103.
 48. Perrin B.J., Ervasti J.M. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010;67(10):630–4. DOI: 10.1002/cm.20475.
 49. Belyantseva I.A., Perrin B.J., Sonnemann K.J. et al. Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:9703–8. DOI: 10.1073/pnas.0900221106.
 50. Bunnell T.M., Ervasti J.M. Delayed embryonic development and impaired cell growth and survival in ACTG1 null mice. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010;67(9):564–72. DOI: 10.1002/cm.20467.
 51. Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G. et al. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 16): 2980–8. DOI: 10.1242/jcs.041970.
 52. Franke W.W., Stehr S., Stumpp S. et al. Specific immunohistochemical detection of cardiac/fetal alpha-actin in human cardiomyocytes and regenerating skeletal muscle cells. *Differentiation* 1996;60(4):245–50. DOI: 10.1046/j.1432-0436.1996.6040245.x.
 53. Шагиева Г.С., Домнина Л.В., Чипышева Т.А. и др. Реорганизация изоформ актина и адгезионных контактов при эпителиально-мезенхимальном переходе в клетках цервикальных карцином. *Биохимия* 2012;77(11):1513–25. [Shagieva G.S., Domnina L.V., Chipysheva T.A. et al. Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells. *Biokhimiya = Biochemistry* 2012;77(11):1513–25. (In Russ.)].
 54. Baranwal S., Naydenov N.G., Harris G. et al. Nonredundant roles of cytoplasmic β - and γ -actin isoforms in regulation of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell* 2012;23(18):3542–53. DOI: 10.1091/mbc.E12-02-0162.
 55. Дугина В.Б., Чипышева Т.А., Ермилова В.Д. и др. Распределение изоформ актина в клетках нормальной, диспластической и опухолевой ткани молочной железы. *Архив патологии* 2008;70(2):28–31. [Dugina V.B., Chipysheva T.A., Ermilova V.D. et al. Distribution of actin isoforms in normal, dysplastic and cancer breast cells. *Arkhiv patologii = Pathology Archive* 2008;70(2):28–31. (In Russ.)].
 56. Dugina V., Arnoldi R., Janmey P.A., Chaponnier C. Actin. In: *The Cytoskeleton and Human Disease*. Ed. by M. Cavallaris. Humana Press-Springer, 2012. Pp. 3–28.
 57. Brockmann C., Huarte J., Dugina V. et al. Beta- and gamma-cytoplasmic actins are required for meiosis in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2011;85(5):1025–39. DOI: 10.1095/biolreprod.111.091736.
 58. Pokorná E., Jordan P.W., O'Neill C.H. et al. Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil*

- Cytoskeleton 1994;28(1):25–33.
DOI: 10.1002/cm.970280103.
59. Sahai E., Marshall C.J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003;5(8):711–9.
DOI: 10.1038/ncb1019.
 60. Leavitt J., Gunning P., Kedes L., Jariwalla R. Smooth muscle alpha-actin is a transformation-sensitive marker for mouse NIH 3T3 and Rat-2 cells. *Nature* 1985;316(6031):840–2.
 61. Witt D.P., Brown D.J., Gordon J.A. Transformation-sensitive isoactin in passaged chick embryo fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *J Cell Biol* 1983;96(6):1766–71.
 62. Okamoto-Inoue M., Taniguchi S., Sadano H. et al. Alteration in expression of smooth muscle alpha-actin associated with transformation of rat 3Y1 cells. *J Cell Sci* 1990;96(Pt 4):631–7.
 63. Vandekerckhove J., Leavitt J., Kakunaga T., Weber K. Coexpression of a mutant beta-actin and the two normal beta- and gamma-cytoplasmic actins in a stably transformed human cell line. *Cell* 1980;22(3):893–9.
 64. Leavitt J., Ng S.Y., Aebi U. et al. Expression of transfected mutant beta-actin genes: alterations of cell morphology and evidence for autoregulation in actin pools. *Mol Cell Biol* 1987;7(7):2457–66.
 65. Sadano H., Taniguchi S., Kakunaga T., Baba T. cDNA cloning and sequence of a new type of actin in mouse B16 melanoma. *J Biol Chem* 1988;263(31):15868–71.
 66. Lapidus K., Wyckoff J., Mouneimne G. et al. ZBP1 enhances cell polarity and reduces chemotaxis. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 18):3173–8.
DOI: 10.1242/jcs.000638.
 67. Shum M.S., Pasquier E., Po'uha S.T. et al. γ -Actin regulates cell migration and modulates the ROCK signaling pathway. *FASEB J* 2011;25(12):4423–33. DOI: 10.1096/fj.11-185447.
 68. Tondeleir D., Lambrechts A., Müller M. et al. Cells lacking β -actin are genetically reprogrammed and maintain conditional migratory capacity. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(8):255–71.
DOI: 10.1074/mcp.M111.015099.
 69. Pawlak G., Helfman D.M. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11(1):41–7.
 70. Pollack R., Osborn M., Weber K. Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(3):994–8.
 71. Rubin R.W., Warren R.H., Lukeman D.S., Clements E. Actin content and organization in normal and transformed cells in culture. *J Cell Biol* 1978;78(1):28–35.
 72. Verderame M., Alcorta D., Egnor M. et al. Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloidin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(11):6624–8.
 73. Shagieva G., Domnina L., Makarevich O. et al. Depletion of mitochondrial reactive oxygen species downregulates epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(3):4901–13, in print.
 74. Дугина В.Б., Ермилова В.Д., Черемис Г.Ю., Чипышева Т.А. Актины и кератины в диагностике базальноподобного рака молочной железы человека. *Архив патологии* 2010;(72):12–5. [Dugina V.B., Ermilova V.D., Cheremis G.Yu., Chipysheva T.A. Actins and keratins in diagnostics of human basal-like breast cancer. *Arkhiv patologii = Pathology Archive* 2010;72(2):12–5. (In Russ.)].
 75. Агапова Л.С., Черняк Б.В., Домнина Л.В. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии как средство, прерывающее программу старения. SKQ1 подавляет развитие опухолей из P53-дефицитных клеток. *Биохимия* 2008;73(12):1300–16. [Agapova L.S., Chernyak B.V., Domnina L.V. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. Inhibitory effect of SKQ1 on tumor development from P53-deficient cells. *Biokhimiya = Biochemistry* 2008;73(12):1300–16. (In Russ.)].
 76. Dugina V., Khromova N., Rybko V. et al. Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms. *Oncotarget* 2015;6(16):14556–71. DOI: 10.18632/oncotarget.3989.
 77. Dugina V., Alieva I., Khromova N. et al. Interaction of microtubules with the actin cytoskeleton via cross-talk of EB1-containing +TIPs and γ -actin in epithelial cells. *Oncotarget* 2016;7(45):72699–715. DOI: 10.18632/oncotarget.12236.

Тимидинкиназа 1 как потенциальный опухолеассоциированный маркер: структура, функции, активность в нормальных и опухолевых тканях

Н.С. Сергеева^{1,2}, Н.К. Парилова¹, Н.В. Маршуткина¹, И.С. Мейснер²

¹Отделение прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

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

Контакты: Наталья Сергеевна Сергеева prognos.06@mail.ru

В обзоре представлены данные о роли тимидинкиназы (ТК) в обеспечении репликации ДНК *de novo* и посредством запасного (*salvage*) пути в норме, а также при активации запасного пути при канцерогенезе. Описаны структура цитоплазматической ТК (ТК-1), называемой также фетальной, регуляция ее уровня и активности в клетках и их изменения на протяжении клеточного цикла. С учетом данных об отсутствии ТК-1 в покоящихся (G_0) клетках она позиционируется в литературе как маркер пролиферирующих клеток, активность которого регистрируется, начиная с поздней G_1 -фазы и достигая максимума в S -фазе, сохраняется в G_2 -фазе и митозе, быстро снижается до неопределяемых значений в ранней G_1 -фазе.

Систематизированы данные об экспрессии ТК-1 (в сопоставлении с Ki-67 и PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)) в опухолевых тканях (при колоректальном раке, раке молочной железы, шейки матки, легкого, почки, предстательной железы, яичников), а также при некоторых доброкачественных и предопухолевых патологических процессах в сопоставлении с их клинико-диагностическими характеристиками. Представленные данные свидетельствуют о том, что исследования индекса пролиферации по ТК-1 (с антителами к домену HRA-210) целесообразно использовать наряду с Ki-67 и PCNA для более полной оценки пролиферативного статуса злокачественных новообразований, а также предраковых и доброкачественных состояний в целях прогнозирования течения опухолевого процесса и планирования тактики лечения.

Ключевые слова: тимидинкиназа 1 (ТК-1), Ki-67, PCNA, клеточный цикл, канцерогенез

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-17-23

The thymidine kinase-1 as a potential tumor marker: structure, function, activity in normal and malignant tissues

N.S. Sergeeva^{1,2}, N.K. Parilova¹, N.V. Marshutina¹, I.S. Meysner²

¹Department of Conservative Treatment Prognosis, P.A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

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

In the review the role of the thymidine kinase (TK) to ensure the replication of DNA *de novo* and spare (*salvage the*) way in health and activate alternate ways in carcinogenesis is described. The structure of cytoplasmic TK (TK-1), also called fetal, and the level of regulation of its activity in the cells and their change during the cell cycle is described. Considering the data about the absence of TK-1 in resting (G_0) cells, TK-1 is positioned as a marker of proliferating cells, which activity is recorded from late G_1 phase, peaking in S -phase, it is stored in the G_2 and mitosis, quickly decreasing to undetectable levels in the early G_1 phase.

Data on the expression TK-1 (as compared with Ki-67 and PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)) in tumor tissues (colorectal, breast, cervical, lung, renal, prostate and ovarian cancer), as well as some benign and precancerous pathological processes in relation to the clinical and diagnostic features of these processes are systemized. These data suggest that the proliferative index studies on TK-1 (antibody to the domain HRA-210) should be used together with Ki-67 and PCNA, for a more complete assessment of the proliferative status of malignant tumors and pre-cancerous and benign conditions, with the aim of prognosis of the tumor process and treatment planning.

Key words: thymidine kinase 1 (TK-1), Ki-67, PCNA, cell cycle, carcinogenesis

Введение

Одним из новых классов опухолеассоциированных маркеров являются так называемые метаболические маркеры, т.е. ферменты, обеспечивающие формирование или поддержание опухолевого фенотипа клеток.

Выделение их в отдельный класс обусловлено тем, что сначала была изучена их функция, а далее получены антитела для их идентификации. Это отличает их от «классических» сывороточных опухолеассоциированных маркеров (углеводного антигена (CA-125),

простатического специфического антигена (ПСА), карбогидратного антигена (СА-19-9) и др.), которые были идентифицированы иммунологическими методами, а в дальнейшем начато исследование их функций.

Один из таких метаболических опухолеассоциированных маркеров, перспективных для клинического использования, — тимидинкиназа (ТК).

Структура и функции тимидинкиназы 1

Поддержание баланса дезоксирибонуклеотидов (ДРН) в клетках эукариот — необходимое условие для репликации и репарации ДНК. Синтез ДРН осуществляется 2 путями: *de novo* и альтернативным (запасным, *salvage*) [1, 2]. При подготовке к делению в клетке *de novo* начинается синтез ДРН из рибонуклеотидов с участием ферментов рибонуклеотид-редуктазного комплекса [1, 3]. В интенсивно делящихся клетках в условиях энергетического дефицита активируются и реакции запасного пути синтеза с использованием продуктов катаболизма нуклеиновых кислот (реутилизация) [1]. В запасном пути первый этап фосфорилирования дезоксирибонуклеозидов катализируют дезоксирибонуклеозидкиназы [4] с различной субстратной специфичностью: 2 цитозольных — тимидинкиназа-1 (ТК-1) и дезоксицитидинкиназа; и 2 митохондриальных — тимидинкиназа-2 (ТК-2) и дезоксигуанозинкиназа [2]. ТК-1 отличаются узкой специфичностью и регуляция синтеза на уровне транскрипции по механизму индукции и репрессии в разных фазах клеточного цикла [1, 5–7]. Основная функция ТК-1 — фосфорилирование тимидинсодержащего нуклеозида до дезокситимидинмонофосфата, который в дальнейшем фосфорилируется до дезокситимидинтрифосфата, непосредственно участвующего в репликации ДНК [1, 8]. Тимидиловые нуклеотиды специфичны для ДНК, поэтому детекция субстратов, продуктов, а также ферментов в реакциях с их участием является ключевой для обнаружения делящихся клеток. Эксперименты, демонстрирующие проникновение меченого дезокситимидина (H^3 -Tdh) в делящиеся клетки, его дальнейшее фосфорилирование с последующим включением в ДНК, стали одним из важнейших открытий в области клеточной биологии и обеспечили возможность для идентификации делящихся клеток и детекции различных фаз клеточного цикла [9, 10]. С другой стороны, эти эксперименты стали одними из первых по изучению ТК-1 [11–13].

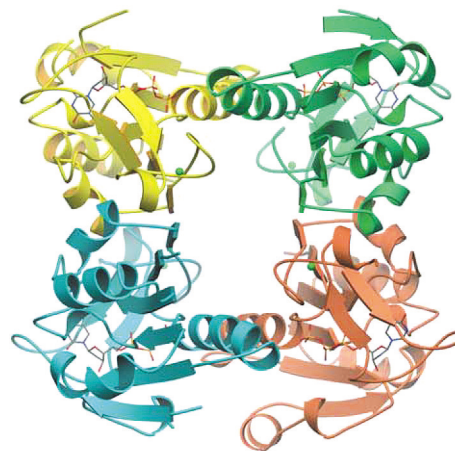
Включение дезокситимидина в метаболизм ДНК описано Р. Reichard и В. Estborn еще в 1951 г., реакция фосфорилирования дезокситимидина — А. Kornberg, I.R. Lehman и E.S. Simms в 1956 г. [9, 10]. В 1958–1960 гг. было доказано, что именно ТК катализирует данную реакцию, и данный фермент был выделен в чистом виде [14–16]. В начале 60-х годов прошлого века изоформы ТК обнаружены у разных видов прокариот и эукариот, а также у некоторых вирусов [17–20]. Изоформы ТК клеток эукариот сегодня категоризируют как цитоплазматиче-

скую (фетальную) форму ТК (ТК-1) [5, 16, 21] и митохондриальную ТК (ТК «взрослых», или ТК-2), экспрессия которой не зависит от клеточного цикла [22, 23].

В середине 70-х годов прошлого века установлена локализация гена *TK-1* в хромосоме 17 в области q21–22, рядом с локусом галактокиназы [24], а позднее локализация была уточнена — 17q25.2–25.3 [25]. В 1980-х гг. прошлого века обнаружено, что наследственная недостаточность галактокиназы сопровождается и недостаточностью ТК-1 [26]. Ген *TK-1* был клонирован [27], и установлена частота его полиморфизмов [28]. В 1986 г. В. Dutrillaux и М. Muleris показали, что при хромосомном дисбалансе увеличивается синтез нуклеотидов по запасному пути, что наблюдается при канцерогенезе [29].

Структура ТК-1 полностью расшифрована. Белок ТК-1 человека имеет молекулярную массу 25,4 кДа и состоит из 234 аминокислотных остатков [2, 30]. В неактивной форме ТК-1 присутствует в тканях в виде димера с молекулярной массой ~ 50 кДа. При активации формируется гомотетрамер с молекулярной массой ~ 100 кДа (см. рисунок) [30–32].

Рекомбинантная форма ТК-1 не способна формировать тетрамер, что подтверждает важность ряда посттрансляционных модификаций этого фермента [2, 33, 34]. Каждая субъединица гомотетрамера ТК-1 состоит из 2 доменов: α/β -домена и цинксодержащего домена. Активный центр фермента находится между 2 этими доменами. По своему строению α/β -домен сходен с аденозинтрифосфатсвязывающим доменом ферментов семейства RecA- F_1 ATPase, которое включает несколько геликаз и «ДНК-восстанавливающих» белков, участвующих в репарации и поддержании стабильной структуры ДНК бактерий. Небольшой цинксодержащий домен ТК-1 состоит из 70–80 аминокислот и формирует длинную лассообразную петлю (аминокислоты Gly₁₆₇–Lys₁₈₀), которая отвечает за связь с тимидином. Домен ХРА-161 в данной петле консервативен у разных видов млекопитающих [35–37]. Пептид Ala₁₆₁–Ser₁₈₃,



Пространственное изображение тимидинкиназы 1 человека. Субъединицы А–D в тетрамере окрашены оранжевым, голубым, желтым и зеленым цветами (адаптировано из [32])

содержащий домен XPA-161, был синтезирован и использован в целях получения поли- и моноклональных антител к ТК-1 (anti-XPA-161) в ходе создания наборов для иммунохимической детекции фермента [38]. Также для получения поли- и моноклональных антител (anti-XPA-210) использовали пептид Gly₁₉₅–Gln₂₂₅, соответствующий домену XPA-210, который представляет собой С-концевой пептид ТК-1. Его аминокислотная последовательность оказалась также видоспецифичной [39]. Таким образом, для идентификации клеток в поздней G₁- и S-фазах цикла, содержащих повышенные уровни ТК-1, используются оба этих типа анти-ТК-1-антител, строго специфичных для ТК-1 человека [39].

Позднее было показано, что основная доля циркулирующей в крови ТК-1 представлена формой с молекулярной массой 730 кДа. Это связано с образованием в сыворотке крови комплекса фермента с белками, что в конечном итоге повышает его стабильность [30, 31].

Регуляция уровня и активности тимидинкиназы 1 в клетке

Исторически ТК-1 относят к группе S-специфических ферментов, активность которых повышается (в 10–20 раз) при вступлении клетки в S-фазу, а после ее завершения активность снижается. Изменение активности обеспечивается 2 регуляторными механизмами, один из которых отвечает за повышение ферментативной активности на протяжении S-фазы, другой обеспечивает down-регуляцию после ее завершения [7].

В 1974 г. установлено, что периодическое повышение и снижение активности фермента в клетках (линия KB) совпадает с началом и окончанием репликации ДНК [5]. Авторами было показано, что скорость синтеза ТК-1 определяется интенсивностью транскрипции кодирующей фермент матричной РНК (мРНК), которая снижается при завершении репликации ДНК [5]. В этой же публикации было уточнено, что завершение синтеза ТК-1 по времени более точно совпадает не с завершением S-фазы, а с началом митоза, т. е. с окончанием G₂-фазы [5].

В 1987 г. D.L. Sorposk и A.B. Pardee на клеточной культуре 3T3 *in vitro* подтвердили, что повышение активности ТК-1 в клетке связано с увеличением уровня ее мРНК [40]. Авторами установлено, что при переходе клетки из G₁-фазы в S-фазу возрастают не только интенсивность транскрипции гена *TK1* (в 2–4 раза) и уровни мРНК ТК-1 (более чем в 20 раз), но и время полураспада ТК-1 (с 8 до 12 ч) [40].

В 1988 г. J.L. Sherley и T.J. Kelly, используя синхронизированные культуры HeLa-клеток, выявили корреляцию количества белка ТК-1 с его активностью на протяжении всех стадий клеточного цикла [7]. При переходе из G₁-фазы в S-фазу возрастали уровень мРНК (~ в 3 раза) и скорость синтеза ТК-1 (~ в 10 раз) и, соответственно, концентрация и активность ТК-1 в клетках быстро увеличивались (~ в 15

раз) в начале S-фазы, достигая своих максимальных уровней в G₂-фазе. Это позволило авторам сделать вывод о том, что активное накопление ТК-1 в клетке на протяжении S-фазы обусловлено в большей степени активацией трансляции с мРНК.

В 2009 г. было подтверждено, что возрастание уровня ТК-1 происходит уже в поздней G₁-фазе клеточного цикла, достигая пика в ранней S-фазе [39], опережая как увеличение уровня Ki-67 (маркера клеточной пролиферации) [41], так и включение BrdU (маркера S-фазы клеточного цикла) в цепь ДНК [39]. Таким образом, установлено, что ТК-1 является уникальным маркером клеток, которые прошли точку рестрикции в G₁-фазе, т. е. надежным маркером пролиферации [39].

Снижение уровня ТК-1 наряду с плавным уменьшением количества мРНК ТК-1 начинается в конце G₂-фазы и продолжается в течение митоза, что обусловлено как специфическим разрушением белка, так и снижением скорости его синтеза [7, 42]. При этом уменьшение активности и количества ТК-1 не предшествует снижению уровня ее мРНК и не превосходит его по степени [42].

Время полураспада белка ТК-1 на протяжении значительной части жизненного цикла клетки остается постоянным, составляя около 40 ч. Однако непосредственно после завершения митоза (в ранней G₁-фазе) за короткий интервал времени стабильность белка резко снижалась (время полураспада < 1 ч), что обеспечивало быстрое освобождение дочерних клеток от этого фермента [7].

В 1991 г. M.G. Kauffman и T.J. Kelly выявили, что внутриклеточная деградация фермента начинается со связывания убиквитина с С-концевым фрагментом фермента (KEN) и завершается в протеасомах [43]. С-концевая делеция участка из 40 аминокислот или присоединение бета-галактозидазы к карбоксильному концу ТК-1 стабилизировало белок на протяжении всего клеточного цикла без изменения специфической ферментной активности [43, 44].

Механизм строгого контроля активности ТК-1 в клетке подчеркивает значимость этого фермента в регуляции внутриклеточного уровня дезокситимидинтрифосфата. В частности, показано, что нарушение протеолиза ТК-1 ассоциировано с повышением частоты генных мутаций в клетках [45, 46]. В экспериментах V.N. Dobrovolsky и соавт. в 2003 г. показано, что нокаут гена ТК-1 у мышей приводит к развитию почечной недостаточности и угнетению иммунной системы, и как следствие, к резкому уменьшению продолжительности жизни животных [47].

Многочисленные исследования подтверждают отсутствие ТК-1 в непроделирующихся (покоящихся) клетках [5–7, 40, 48].

Совокупность представленных данных позволяет считать ТК-1 важным биологическим маркером клеточной пролиферации.

Экспрессия тимидинкиназы 1 в опухолевых тканях

В 2002 г. в корпорации SSTK Inc (Шэньчжэнь, Китай) были синтезированы поли- и моноклональные антитела к ТК-1. Эта разработка завершилась созданием высокочувствительных серологических и иммуногистохимических тестов для определения уровня ТК-1 в биологических жидкостях и уровня экспрессии ТК-1 в клетках [37, 49, 50].

С учетом того, что ТК-1 проявляет себя как маркер клеточной пролиферации и практически не обнаруживается в неделящихся клетках, исследования по изучению степени ее экспрессии нашли свое применение в области онкологии [53–66]. В этих работах была сопоставлена экспрессия ТК-1 и 2 других широко используемых маркеров клеточной пролиферации (Ki-67 и PCNA (proliferating cell nuclear antigen)) [41] при ряде солидных злокачественных новообразований (колоректальном раке, раке почки, яичников, шейки матки, предстательной и молочной железы), некоторых доброкачественных опухолях и предраковых состояниях, а также в нормальных тканях [53–66].

При иммуногистохимических исследованиях в опухолевых тканях этот фермент в ряде случаев обнаруживался не только в цитоплазме клеток, но и в их ядре, что, по мнению авторов, связано с перераспределением избытка ТК-1 между ядром и цитоплазмой в активно пролиферирующих опухолевых клетках и являлось неблагоприятным прогностическим признаком течения опухолевого процесса [53–55].

При раке молочной железы ТК-1 выявлялась главным образом в цитоплазме клеток и только в отдельных случаях в ядре [49, 51–53]. Проллиферативный индекс данного маркера в опухолевой ткани (доля ТК-1-положительных клеток) превышал значение индекса пролиферации, измеренного по Ki-67 [52, 53] или PCNA [51], и коррелировал со стадией заболевания и степенью злокачественности опухолевых клеток [50–52]. Степень экспрессии ТК-1 возрастала в ряду: простая протоковая гиперплазия < протоковая гиперплазия с атипией < протоковый рак *in situ* < инвазивный протоковый рак [53]. Доля положительных по ТК-1 клеток при простой протоковой гиперплазии молочной железы (без атипии) не превышала 5 %, в то время как в отдельных случаях рака молочной железы достигала 80–90 % [53]. В одном из приведенных выше исследований показано наличие выраженной корреляции Ki-67 с ТК-1 при опухолях молочной железы [53]. В другом отмечено, что накопление ТК-1 в опухолевых клетках более характерно для распространенных опухолевых процессов и высокой степени злокачественности опухолевых клеток, а Ki-67 — для более ранних стадий опухолевого процесса и низких степеней злокачественности опухолевых клеток [52]. Поэтому авторы считают, что сочетанное исследование Ki-67 и ТК-1 при раке молочной железы позволяет более глубоко и адекватно охарактеризовать пролиферативный статус опухоли и спрогнозировать течение опухолевого процесса [52].

При цервикальной интраэпителиальной неоплазии и инвазивном раке шейки матки ТК-1 обнаруживалась как в цитоплазме, так и в ядре клеток [54]. Проллиферативный индекс, оцененный по ТК-1 в обеих группах, оказался выше, чем по Ki-67. При этом оба этих показателя коррелировали со стадией опухолевого процесса. Степень экспрессии ТК-1 в ядре клеток служила важным прогностическим признаком течения заболевания как при раке *in situ*, так и при инвазивных формах рака шейки матки, а при распространенных формах позволяла идентифицировать больных с благоприятным прогнозом [54].

При раке яичников накопление ТК-1 отмечалось в цитоплазме опухолевых клеток. Проллиферативный индекс по этому маркеру был несколько ниже, чем по Ki-67. Экспрессия ТК-1, как и Ki-67, коррелировала со стадией, степенью злокачественности, размером опухоли, временем безрецидивного течения и 10-летней выживаемостью пациентов. При распространенных стадиях опухолевого процесса низкая экспрессия ТК-1 была ассоциирована с лучшими показателями выживаемости больных [49, 55].

Проллиферативный индекс, оцененный по ТК-1 при аденокарциномах легкого, оказался почти в 2 раза выше, чем индекс, оцененный по Ki-67 (68 % против 36 %), а при плоскоклеточном раке легкого они значимо не различались, превышая у большинства больных 50 %. Высокая степень экспрессии ТК-1 (индекс пролиферации > 25 %) при аденокарциномах коррелировала не только с наличием лимфо-/гематогенной диссеминации, но и с высокой степенью стромальной инвазии и большими размерами первичного опухолевого узла, а также со стадией опухолевого процесса [56–58] и была сопряжена с низкой вероятностью 5-летней выживаемости больных [57, 58].

Экспрессия ТК-1 и PCNA при колоректальном раке не различалась. Проллиферативный индекс, оцененный по обоим маркерам, коррелировал со стадией заболевания, а по ТК-1 и со степенью злокачественности опухолевых клеток [59]. Степень экспрессии как ТК-1, так и PCNA при аденомах кишки была ниже, чем при колоректальном раке [59]. При аденоматозных полипах более 2 см с широким основанием степень экспрессии ТК-1 оказалась выше, чем при полипах на «тонкой» ножке. В нормальном эпителии толстой кишки уровень экспрессии ТК-1 не превосходил нескольких процентов [49, 59, 60].

Экспрессия ТК-1 при раке почки зависела от гистологического типа опухоли [49, 61–63]. Так, при светлоклеточном раке почки G. Gakis и соавт. [59] отмечали наличие высокой доли интенсивно окрашенных антителами к ХРА-210 опухолевых клеток, причем в ядрах экспрессия ХРА-210 была выше, чем в цитоплазме. В отличие от результатов, описанных для новообразований других локализаций, между размером опухоли и экспрессией ХРА-210 при раке почки выявлена обратная корреляция: пролиферативный

индекс маркера был выше при размерах опухоли < 7 см по сравнению с более крупными опухолями. Авторы объясняют это ухудшением трофики больших по размеру опухолей [49, 61]. Опухолевые клетки из «не-костных» метастазов светлоклеточного рака почки отличались высокой ядерной экспрессией ХРА-210, а в клетках костных метастазов экспрессия данного антигена не обнаруживалась [61]. S. Kruck и соавт. выявили высокую экспрессию ХРА-210 при светлоклеточном и папиллярном типах почечно-клеточного рака; экспрессия маркера при хромофобном раке почки не отличалась от таковой в здоровой ткани почки. Установлена корреляция степени экспрессии ХРА-210 со стадией процесса, а также со степенью злокачественности опухолевой ткани почечно-клеточного рака [62]. Р. Luo и соавт. установили, что содержание ТК-1 в опухолевых клетках почки ниже, чем в нормальных клетках почечных канальцев, и выше, чем в клетках гломерулярного аппарата и промежуточной соединительной ткани здоровой почки [63].

При раке мочевого пузыря ТК-1 обнаруживалась главным образом в цитоплазме клеток. Степень экспрессии маркера при инвазивном раке мочевого пузыря была во много раз выше, чем в здоровой ткани. В норме экспрессия ТК-1 выявлена в основном в клетках базального слоя уротелия мочевого пузыря [64].

В здоровой ткани предстательной железы и в участках доброкачественной гиперплазии экспрессия ТК-1

не определялась [65]. При интраэпителиальной неоплазии отмечался сравнительно невысокий уровень экспрессии ТК-1 (индекс пролиферации $\sim 17\%$), а у больных раком предстательной железы пролиферативный индекс по данному маркеру составлял в среднем около 57% , что несколько превышало значение, установленное по Ki-67 ($\sim 47\%$) [65]. При исследовании экспрессии ХРА-210 установлено, что интенсивность окрашивания клеток коррелировала со стадией опухолевого процесса и оценкой злокачественности по шкале Глисона. Кроме того, высокий уровень экспрессии ХРА-210 коррелировал с коротким временем как до развития биохимического рецидива заболевания, так и до визуализации метастазов [66].

Заключение

Таким образом, в соответствии с результатами ряда исследований ТК-1 позиционируется как маркер пролиферирующих клеток, степень экспрессии которого коррелирует со стадией процесса и морфологической злокачественностью опухолевой ткани. Исследования индекса пролиферации по ТК-1 (с антителами к домену ХРА-210) целесообразно использовать наряду с Ki-67 и PCNA для более полной оценки пролиферативного статуса злокачественных новообразований, а также предраковых и доброкачественных состояний в целях прогнозирования течения опухолевого процесса и планирования тактики лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Силаева С.А. Раздел 10. Обмен нуклеотидов. В кн.: Биохимия. Учебник для вузов. Под ред. Е.С. Северина, 2003. 779 с. С. 521–44. [Silava S.A. Section 10. Nucleotide metabolism. In: Biochemistry. University textbook. Ed. by E.S. Severin, 2003. 779 p. Pp. 521–44. (In Russ.)].
2. Welin M., Kosinska U., Mikkelsen N.-E. et al. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasma origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(52): 17970–5.
3. Jordan A., Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:71–98.
4. Arner E.S., Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* 1995;67(2):155–86. DOI: 10.1016/0163-7258(95)00015-9.
5. Bello L.J. Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells. *Exp Cell Res* 1974;89(2):263–74.
6. Munch-Petersen B., Tyrsted G. Induction of thymidine kinases in phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1977;478(3): 364–75.
7. Sherley J.L., Kelly T.J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 1988;263(17):8350–8.
8. Segura-Pena D., Lichter J., Trani M. et al. Quaternary structure change as a mechanism for the regulation of thymidine kinase 1-like enzymes. *Structure* 2007;15(12):1555–66. DOI: 10.1016/j.str.2007.09.025. PMID: 18073106.
9. Kornberg A., Lehman I.R., Simms E.S. Polydeoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *Fed Proc* 1956;15: 291–2.
10. Reichard P., Estborn B. Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J Biol Chem* 1951;188(2):839–46. PMID: 14824173.
11. Mathews C.K. Enzymatic channeling of DNA precursors. *Basic Life Sci* 1985;31:47–66.
12. Leeds J.M., Mathews C.K. Cell cycle-dependent effects on deoxyribonucleotide and DNA labeling by nucleoside precursors in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987;7(1):532–4.
13. Nicander B., Reichard P. Dynamics of pyrimidine deoxynucleoside triphosphate pools in relationship to DNA synthesis in 3T6 mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(5): 1347–51.
14. Bollum F.J., Van Potter R. Incorporation of thymidine into deoxyribonucleic acid by enzymes from rat tissues. *J Biol Chem* 1958;233:478–82.
15. Bollum F.J., Van Potter R. Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Res* 1959;19:561–5.
16. Weissman S.M., Smellie R.M., Paul J. Studies on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts of mammalian cells. IV. The phosphorylation of thymidine. *Biochim Biophys Acta* 1960;45:101–10.
17. Okazaki R., Kornberg A. Deoxythymidine kinase of *Escherichia coli*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J Biol Chem* 1964;239:269–74.
18. Hotta Y., Stern H. Molecular facets of mitotic regulation I. Synthesis of thymidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963;49(5):648–54.
19. Chello P.L., Jaffe J.J. Comparative properties of trypanosomal and mammalian thymidine kinases. *Comp Biochem Physiol* 1972;43(3):543–62.

20. Kit S., Dubbs D.R. Acquisition of thymidine kinase activity by *Herpes simplex* infected mouse fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:55–9.
21. Littlefield J.W. The periodic synthesis of thymidine kinase in mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1966;114(2): 398–403.
22. Berk A.J., Clayton D.A. A genetically distinct thymidine kinase in mammalian mitochondria. Exclusive labeling of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1973;248(8):2722–9.
23. Berk A.J., Meyer B.J., Clayton D.A. Mitochondrial-specific thymidine kinase. *Arch Biochem Biophys* 1973;154(2): 563–5.
24. Elsevier S.M., Kucherlapati R.S., Nichols E.A. et al. Assignment of the gene for galactokinase to human chromosome 17 and its regional localisation to band q21–22. *Nature* 1974;251(5476):633–6.
25. Kuo W.L., Hirschhorn R., Huie M.L., Hirschhorn K. Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1996;97(3):404–6.
26. Schoen R.C., Cox S.H., Wagner R.P. Thymidine-kinase activity of cultured cells from individuals with inherited galactokinase deficiency. *Am J Hum Genet* 1984;36(4):815–22.
27. Bradshaw H.D. Jr, Deininger P.L. Human thymidine kinase gene: molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA expressible in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1984;4(11):2316–20.
28. Murphy P.D., Kidd J.R., Castiglione C.M. et al. A frequent polymorphism for the cytosolic thymidine kinase gene, TK1, (17q21–q22) detected by the enzyme TaqI. *Nucleic Acids Res* 1986;14(10):4381.
29. Dutrillaux B., Muleris M. Induction of increased salvage pathways of nucleotide synthesis by dosage effect due to chromosome imbalances may be fundamental in carcinogenesis: the example of colorectal carcinoma. *Ann Genet* 1986;29(1):11–5.
30. Hanan S., Jagarlamudi K.K., Liya W. et al. Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of thymidine kinase 1 from dogs and humans. *BMC Biochem* 2012;13:12. DOI: 10.1186/1471-2091-13-12. PMID: 22741536.
31. Karlström A.R., Neumüller M., Gronowitz J.S., Källander C.F. Molecular forms in human serum of enzymes synthesizing DNA precursors and DNA. *Mol Cell Biochem* 1990;92(1):23–35.
32. Birringer M.S., Claus M.T., Folkers G. et al. Structure of a type II thymidine kinase with bound dTTP. *FEBS Lett* 2005;579(6):1376–82. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.034.
33. Munch-Petersen B., Cloos L., Jensen H.K., Tyrsted G. Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Adv Enzyme Regul* 1995;35:69–89.
34. Li C.L., Lu C.Y., Ke P.Y., Chang Z.F. Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(3):587–93.
35. He Q., Wang N., Skog S. et al. Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation. *Eur J Cell Biol* 1996;70(2):117–24.
36. Wang N., He Q., Skog S. et al. Investigation on cell proliferation with new antibody against thymidine kinase 1. *Anal Cell Pathol* 2001;23(1):11–9.
37. Wu C., Yang R., Zhou J. et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *J Immunol Methods* 2003;277(1–2): 157–69.
38. Eriksson S. New exposed proliferation related peptide, ligands and methods employing the same. PCT application WO 2008:142664.
39. Gasparri F., Wang N., Skog S. et al. Thymidine kinase 1 expression defines as activated G1 state of cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan assays. *Eur J Cell Biol* 2009;88(12):779–85.
40. Coppock D.L., Pardee A.B. Control of thymidine kinase mRNA during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1987;7(8):2925–32.
41. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31(1):13–20.
42. Gross M.K., Kainz M.S., Merrill G.F. The chicken thymidine kinase gene is transcriptionally repressed during terminal differentiation: the associated decline in TK mRNA cannot account fully for the disappearance of TK enzyme activity. *Dev Biol* 1987;122(2):439–51.
43. Kauffman M.G., Kelly T.J. Cell cycle regulation of thymidine kinase: residues near the carboxyl terminus are essential for the specific degradation of the enzyme at mitosis. *Mol Cell Biol* 1991;11(5):2538–46.
44. Sutterluety H., Bartl S., Karlseder J. et al. Carboxy-terminal residues of mouse thymidine kinase are essential for rapid degradation in quiescent cells. *J Mol Biol* 1996;259(3):383–92.
45. Hu C.M., Chang Z.F. Mitotic control of dTTP pool: a necessity or coincidence? *J Biomed Sci* 2007;14(4):491–7.
46. Ke P.Y., Kuo Y.Y., Hu C.M., Chang Z.F. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev* 2005;19(16):1920–33.
47. Dobrovolsky V.N., Bucci T., Heflich R.H. et al. Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Mol Genet Metab* 2003;78(1):1–10.
48. Ke P.Y., Chang Z.F. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* 2004;24(2):514–26.
49. Zhou J., He E., Skog S. The proliferation marker thymidine kinase 1 in clinical use. *Mol Clin Oncol* 2013;1(1):18–28.
50. Kuroiwa N., Nakayama M., Fukuda T. et al. Specific recognition of cytosolic thymidine kinase in the human lung tumor by monoclonal antibodies raised against recombinant human thymidine kinase. *J Immunol Methods* 2001;253(1–2):1–11.
51. Mao Y., Wu J., Wang N. et al. A comparative study: immunohistochemical detection of cytosolic thymidine kinase and proliferating cell nuclear antigen in breast cancer. *Cancer Invest* 2002;20(7–8): 922–31.
52. He Q., Mao Y., Wu J. et al. Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas. *Int J Oncol* 2004;25(4):945–53.
53. Guan H., Sun Y., Zan Q. et al. Thymidine kinase 1 expression in atypical ductal hyperplasia significantly differs from usual ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ: A useful tool in tumor therapy management. *Mol Med Rep* 2009;2(6):923–9. DOI: 10.3892/mmr.00000193.
54. Chen G., He C., Li L. et al. Nuclear TK1 expression is an independent prognostic factor for survival in pre-malignant and malignant lesions of the cervix. *BMC Cancer* 2013;13:249. DOI: 10.1186/1471-2407-13-249.
55. Liu C., Gao Q., Shi Q.L. et al. Significance of TK1 and Ki-67 expression in ovarian serous adenocarcinoma. *J Clin Exp Pathol* 2011;27:1289–93.
56. Mao Y., Wu J., Skog S. et al. Expression of cell proliferating genes in patients with non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and cDNA profiling. *Oncol Rep* 2005;13(5): 837–46.
57. Xu Y., Liu B., Shi Q.L. et al. Thymidine kinase 1 is a better prognostic marker than Ki-67 for pT1 adenocarcinoma of the lung. *Int J Clin Exp Med* 2014;7(8):2120–8.
58. Xu Y., Shi Q.L., Ma H. et al. High thymidine kinase 1 (TK1) expression is a predictor of poor survival in patients with pT1 of lung adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2012;33(2):475–83. DOI: 10.1007/s13277-011-0276-0.
59. Wu J., Mao Y., He L. et al. A new cell proliferating marker: cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20(6C):4815–20.

60. Wei J.W., Xu C.R., Zen D.Z., Chen Y. Analysis on the content of TK1 of patients with colonic polyps. *Lab Med Clin* 2011;8:769.
61. Gakis G., Hennenlotter J., Scharpf M. et al. XPA210: a new proliferation marker to characterize tumor biology and progression of renal cell carcinoma. *World J Urol* 2011;29(6):801–6. DOI: 10.1007/s00345-010-0621-8.
62. Kruck S., Hennenlotter J., Vogel U. et al. Exposed proliferation antigen 210 (XPA-210) in renal cell carcinoma (RCC) and oncocytoma: clinical utility and biological implications. *BJU Int* 2012;109(4):634–8. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10392.x.
63. Luo P., Wang N., He E. et al. The proliferation marker thymidine kinase 1 level is high in normal kidney tubule cells compared to other normal and malignant renal cells. *Pathol Oncol Res* 2010;16(2):277–83. DOI: 10.1007/s12253-009-9222-5.
64. Rausch S., Hennenlotter J., Teepe K. et al. Muscle-invasive bladder cancer is characterized by overexpression of thymidine kinase 1. *Urol Oncol* 2015;33(10):426.e21–9. DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.06.007.
65. Ye F.P., Xie Q.L., Liu X.L. et al. Expression of TK1 and Ki67 in prostate diseases. *J Clin Exp Pathol* 2008;24:644–67.
66. Aufderklamm S., Hennenlotter J., Todenhoefer T. et al. XPA-210: a new proliferation marker determines locally advanced prostate cancer and is a predictor of biochemical recurrence. *World J Urol* 2012;30(4):547–52. DOI: 10.1007/s00345-011-0768-y.

Внутриопухолевая гетерогенность и клональная эволюция рака толстой кишки

М.Ю. Федянин, Х.Х.-М. Эльснукеева, С.А. Тюлядин

Отделение клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Михаил Юрьевич Федянин fedianinmu@mail.ru

Все больше работ в онкологии посвящается молекулярно-генетическим различиям между первичной опухолью и метастазами. Это становится актуальным не только для молекулярного биолога в рамках понимания фундаментальных процессов канцерогенеза, но приобретает все большее значение и для клинициста в связи с возможным влиянием на выбор терапии метастатического процесса с учетом наличия ряда генетических предикторных маркеров для таргетных препаратов. Рак толстой кишки в этом плане является интересной моделью для изучения как первичной гетерогенности опухоли, так и процессов эволюции заболевания на фоне терапии. В данном обзоре проведен анализ работ по изучению конкордантности мутационного статуса генов при раке толстой кишки, освещены вопросы внутриопухолевой гетерогенности и процессы клональной эволюции при данной патологии.

Ключевые слова: рак толстой кишки, внутриопухолевая гетерогенность, биомаркер, KRAS, NRAS, BRAF, клональная эволюция, таргетная терапия, конкордантность, анти-EGFR-моноклональные антитела

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-24-34

Heterogeneity and clonal evolution of colorectal cancer

M.Yu. Fedyanin, H.H.-M. Elsnukaeva, S.A. Tjulandin

Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

There are a lot of studies that dedicated to genetic differences between the primary tumor and metastases. This becomes relevant not only for molecular biologists for understanding carcinogenesis, but also becoming increasingly important for medical oncologists, due to the possible impact on the choice of therapy for metastatic disease. In this regard, colon cancer is an interesting model for studying the heterogeneity of the primary tumor and possible clonal evolution, because we have predictive genetic markers for target therapy. In this article, we analyzed studies on the concordance of the mutation status of the genes, intratumoral heterogeneity and processes of clonal evolution in colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer, intratumoral heterogeneity, biomarker, KRAS, NRAS, BRAF, clonal evolution, targeted therapy, concordance, anti-EGFR-monoclonal antibodies

Длительное время в онкологии существовала гипотеза об идентичности метастазов и первичной опухоли. Предполагали, что, если клетки метастазов происходят из клеток первичной опухоли, они должны нести те же специфические генетические изменения. Исследования, проведенные в 90-х годах прошлого века с использованием кариотипирования, сравнительной геномной гибридизации, флуоресцентной гибридизации *in situ*, анализа маркеров микросателлитной нестабильности и потери гетерозиготности ряда генов, не показали значимых различий между клетками первичной опухоли и метастазов рака толстой кишки (РТК) [1–4].

Развитие методов молекулярно-генетических исследований определило изменение мировоззрения онкологов. Так, появление метода по оценке полиморфизмов отдельных нуклеотидов с высокой плотностью покрытия позволило обнаружить отличия в геноме клеток метастазов и первичной опухоли. В исследовании L. Munoz-Bellvis и соавт. с помощью метода

оценки полиморфизмов отдельных генов (SNP, single nucleotide polymorphism) и числа копий генов всего генома сравнили ДНК из 20 пар фрагментов первичной опухоли и метастазов РТК, полученных от 20 больных. В 100 % сравниваемых пар образцов опухоли отмечены значимые генетические различия, проявляющиеся в увеличении числа копий генов, ассоциированных с метастатическим процессом (в участках хромосом 1p, 7p, 8q, 13q, 17p, 18q и 20q), в 40 % образцах метастазов обнаружено появление новых хромосомных изменений (например, в 4, 10q, 5p и 6p хромосомах). Интересно, что различий в генах репарации неспаренных оснований между первичной опухолью и метастазами не выявлено, все образцы были представлены микросателлитно-стабильными опухолями. Авторы сделали вывод, что изменения в работе генома опухолевых клеток метастаза связаны как с самим метастатическим процессом, так и с адаптацией клеток к новому микроокружению [5]. При изучении хромосомной

нестабильности при РТК методом сравнительной гибридизации отмечено, что в метастазах при сравнении с первичной опухолью чаще встречаются участки измененного генома (FGA, fraction of the genome altered), например в отношении хромосомы 8. Однако применение другого метода оценки геномных нарушений — KC-SMART — не выявило значимых специфических отличий между метастазами и первичной опухолью [6].

Наличие предиктивного маркера эффективности применения анти-EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста) моноклональных антител у больных метастатическим РТК — мутационного статуса генов *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) и *BRAF* — определяет актуальность изучения возможного изменения мутационного статуса генов в метастазах. Результаты ранних исследований по изучению конкордантности между первичной опухолью и метастазами РТК по мутационному статусу гена *KRAS* противоречивы. В одних отмечено отсутствие такой конкордантности [7], в других, наоборот, выявлен высокий процент соответствия [8, 9]. F. Loupakakis и соавт. изучили мутационный статус гена *KRAS* и экспрессию PTEN и АКТ у 106 больных метастатическим РТК, получавших таргетную терапию (режим иринотекан с цетуксимабом). При этом у 53 пациентов данный анализ был проведен в первичной опухоли и в метастазе. Исследователи выявили соответствие изменений между первичной опухолью и метастазами по экспрессии АКТ у 68 %, по экспрессии PTEN — у 60 % и по мутационному статусу гена *KRAS* — у 95 % больных. Также авторы работы обнаружили, что наряду с мутацией в гене *KRAS* неэффективность анти-EGFR-воздействия была отмечена при потере экспрессии PTEN в метастазах [10]. Ранее также исследователями из Италии, наоборот, было показано значимое различие в экспрессии EGFR, pAKT и компонентов MAPK-сигнального пути между первичными опухолями и метастазами РТК, что может свидетельствовать о биологических нарушениях, накапливающихся в процессе прогрессирования заболевания [11–13]. В то же время в других работах обнаружена высокая (78,0–94,7 %) конкордантность по экспрессии EGFR в первичной опухоли и метастазах [14, 15].

В более современных работах исследователи сравнивают не только первичные опухоли и метастазы, но и отдельные участки в самой опухоли. Так, S.E. Baldus и соавт. [16] с помощью метода микродиссекции изучили мутационный статус генов *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* в инвазивных и центральных участках первичной опухоли ($n = 100$), в метастазах в лимфатические узлы (ЛУ) ($n = 55$) и в метастазах в печень ($n = 20$). При сравнении образцов из центральных отделов и фронта инвазии опухоли отмечена дискордантность по мутационному статусу вышеупомянутых генов, которая составила 8, 1 и 5 % соответственно. При этом несоответствие между первичной опухолью и метастазами для *KRAS* выявлено в 10 % случаев, для *PIK3CA* — в 5 % и не отмечено для *BRAF*. В то же время, если сравнивать

первичную опухоль и метастазы в ЛУ, дискордантность по статусу гена *KRAS* достигает 31 %, что противоречит результатам предыдущего исследования. Аналогично низкие показатели конкордантности по статусу гена *KRAS* между метастазами в ЛУ и первичной опухолью обнаружены в работе С. Oliveira и соавт. [17]. Возможным объяснением такого феномена является предположение о более раннем формировании метастазов в ЛУ, чем в органах. Отметим, что в клетках центральных отделов опухоли чаще встречалась мутация в гене *KRAS* по сравнению с образцами из фронта инвазии, что послужило причиной рекомендации авторами забирать материал для мутационного анализа из центральных участков опухоли [18]. Еще в 3 работах выявленная дискордантность по мутационному статусу в гене *KRAS* в различных отделах первичной опухоли оказалась еще выше и составляла от 35 до 47 % [19–21].

Наиболее крупная работа, посвященная оценке конкордантности статуса гена *KRAS* при РТК между первичной опухолью и метастазами в печень, опубликована в 2011 г. В исследование было включено 305 пар образцов, взятых у пациентов с РТК. Выявлен высокий процент (96,4 %) конкордантности по мутационному статусу гена *KRAS* [22]. Авторы объясняют такое высокое соответствие мутационного статуса между первичной опухолью и метастазами большим числом больных, включенных в анализ, однородностью локализации метастатических очагов (только печень) и тем, что исследовался только 1 ген (*KRAS*). По мнению авторов данной работы, в исследованиях с высоким процентом дискордантности размера выборки ($n = 10–110$) не хватало для исключения ложноотрицательных результатов и/или пациенты были неоднородны по локализации метастазов (см. таблицу). Случаи расхождения в статусе генов авторы разных работ объясняют тем, что процесс отдаленного метастазирования начинался раньше возникновения тех или иных мутаций в клетках первичной опухоли. Другим объяснением может служить гетерогенность опухоли по статусу гена *KRAS*. Также можно спекулировать на тему невыявленных вторых первичных опухолей в толстой кишке как источника метастазов с другим мутационным статусом гена. Следует учитывать и метод детекции мутаций в гене *KRAS*. Так, например, при сравнении 3 методов (cobas *KRAS* Mutation Test kit, Therascreen *KRAS* PCR kit, секвенирование по Сэнгеру) только 1-й показывал высокую чувствительность к обнаружению мутантных аллелей гена *KRAS* [23]. Применение наиболее чувствительных методов чаще приводит к выявлению полного соответствия по мутационному статусу первичной опухоли метастазам РТК [9]. Однако встает вопрос о клинической релевантности низкого уровня мутантных аллелей, выявляемых высокочувствительными методами в отношении эффективности анти-EGFR-моноклональных антител. Так, в работе D. Tougeron и соавт. частота объективного эффекта от комбинации анти-EGFR-антител с химиотерапией составила

37,0 % при диком типе гена *KRAS* против 6,7 % в случаях, когда выявлялся даже незначительный процент (< 10 %) мутантных аллелей данного гена [24]. Нельзя исключать банальные ложноположительные и ложноотрицательные результаты тестов [25].

Отметим, что, если сравнивать мутационный статус клеток первичной опухоли и циркулирующих в крови опухолевых клеток, различия более выражены (до 23 % для гена *KRAS* и 7 % для гена *BRAF*) [26, 27].

Что касается мутаций в гене *BRAF*, то интересные данные были получены исследователями из Швейцарии, которые изучили в 100 гистологических образцах различных участков первичной опухоли и метастазов от 13 больных экспрессию VE1, являющейся отражением наличия в опухолевой клетке мутации в гене *BRAF* (V600E). Также была изучена частота встречаемости самой мутации *BRAF* в 123 образцах различных участков опухолей от 13 больных. У 4 пациентов в первичной опухоли была выявлена мутация, при этом гетерогенности в отношении данной мутации в различных участках и метастазах опухоли не отмечено [28]. Такую высокую конкордантность изменений в гене *BRAF* между клетками первичной опухоли и метастазов РТК исследователи объясняют тем, что мутация в данном гене носит драйверный характер и является ранним событием в одном из вариантов канцерогенеза злокачественных опухолей толстой кишки, развивающихся из так называемых зубчатых полипов [29]. С мутацией в гене *BRAF* также ассоциирована экспрессия транскрипционного фактора SOX2, который участвует в поддержании стволовых свойств опухолевых клеток. Иммуногистохимически положительные по экспрессии SOX2 опухоли толстой кишки встречаются в 11 % случаев. Интересно отметить, что при мутации в гене *BRAF* неблагоприятный прогноз течения болезни наблюдается только при коэкспрессии SOX2 в опухоли. При изучении конкордантности экспрессии SOX2 в первичной опухоли и метастазах РТК выявлено, что положительные по экспрессии SOX2 опухоли сохраняют данную экспрессию и в метастазах [30].

Разработка современных методов генетических исследований, например секвенирования нового поколения, позволила достигнуть значительных успехов в молекулярной онкологии. Уже в 2014 г. метод полногеномного секвенирования был применен для оценки изменений в первичной опухоли и синхронных метастазах в печень у 2 больных РТК. Результат анализа показал, что каждая опухоль имеет спектр фракций опухолевых клеток с большим количеством мутаций, которые чаще всего носят клональный характер. Кроме этого, выявляются и некоторые кластеры клеток с субклональными мутациями, что говорит о сосуществовании сразу нескольких субпопуляций опухолевых клеток. Интересно, что у 1 больного до 25 % клональных мутаций первичной опухоли не обнаруживались в метастазах, что может быть объяснено тем, что метастазирование шло в процессе образования данного клона

клеток в первичной опухоли. У 2-го пациента до 95 % клональных мутаций первичной опухоли выявлялись и в метастазах, что говорит о формировании метастазов после образования клонов в первичной опухоли. Соответственно, у 1-го пациента процесс метастазирования развивался параллельно, а у 2-го — последовательно с ростом первичной опухоли. В дальнейшем появление новых мутаций шло независимо в первичной опухоли и в метастазах в процессе их роста [31]. При сравнении 34 пар первичных опухолей и метастазов в печень РТК с помощью секвенирования экзона и РНК авторы другого исследования выделили 3 класса изменений генома. Мутации одинаковы для первичной опухоли и метастазов (1-й класс), что может быть отражением их одинаковой клональной природы. Изменения, специфичные для первичной опухоли, не обнаруживаются в метастазах (2-й класс), что подтверждает поликлональную природу опухоли. Мутации, специфичные для метастазов (3-й класс), на самом деле явление нечастое, однако в метастазах увеличивалось количество мутаций, приводящих к выраженным функциональным изменениям работы клетки, что может говорить о селекции опухолевых клеток с более агрессивным фенотипом [32]. Несколько противоречивые результаты получены при секвенировании 750 генов 18 пар первичных опухолей и метастазов РТК, когда у 88,9 % больных не обнаружено значимых различий в мутационных изменениях между исследованными образцами. Авторы пришли к выводу о наличии линейного, а не параллельного прогрессирования опухолевого процесса. Также следует отметить, что в числовом значении мутантные аллели, по которым отличались первичная опухоль и метастазы, определялись в низком процентном содержании [33]. Оригинальное исследование провели J.S. Vermaat и соавт. при изучении только классических изменений в кодонах 12 и 13 экзона 2 гена *KRAS*. Дискордантность между первичной опухолью и метастазами в печень выявлялась лишь в 14 % случаев. Однако при секвенировании всего гена различия между первичным и метастатическим очагами достигли 52 % [34].

Как видно из таблицы, если изучать клинически значимые мутации, в 90–100 % случаев отмечается совпадение мутационного статуса при определении конкордантности между первичной опухолью толстой кишки и метастазами по генам *KRAS* и *BRAF*. Это подтверждает и метаанализ исследований, опубликованный в 2012 г., включивший результаты 19 работ, посвященных изучению конкордантности мутационного статуса гена *KRAS*, которая составила 94,1 % в отношении всех метастазов и 81,3 % в отношении метастазов в ЛУ. Соответственно, конкордантность была выше между первичной опухолью и отдаленными метастазами [35]. В 2015 г. опубликован аналогичный метаанализ уже 46 исследований, показавший общую конкордантность по мутации гена *KRAS* 92,0 % (73,4 % при метастазах в ЛУ), *BRAF* — 96,8 %, *PIK3CA* — 93,9 %

[36]. Однако в большинстве исследований сравнивали первичную опухоль с синхронно возникающими метастазами и не учитывали возможное влияние характера системной терапии на эволюционный отбор резистентных клонов. В 2014 г. на ежегодной конференции Американского общества клинической онкологии (ASCO) были озвучены результаты 2 работ по изучению гетерогенности РТК. В исследование, проведенное в Онкологическом центре им. М.Д. Андерсона (MD Anderson Cancer Center, США), были включены 115 больных РТК с биопсией или резекцией первичной опухоли и метастазов. Синхронная резекция первичной опухоли и метастазов была выполнена у 33 % пациентов, а 61 % больных между резекцией первичной опухоли и взятием материала из метастаза получали химиотерапию. У 107 пациентов после микродиссекции гистологического материала определен статус 46 генов. Таргетное ресеквенирование 202 генов выполнено 17 больным. Конкордантность между первичной опухолью и метастазами по состоянию генов была отмечена у 89 % пациентов по гену *KRAS*, у 85 % — по гену *APC*, у 83 % — по генам *BRAF* и *NRAS*, у 82 % — по гену *TP53*, у 71 % — по гену *SMAD*, у 53 % — по гену *PIK3CA*. Наблюдались различия в дискордантности между пациентами с синхронной и метасинхронной резекцией первичной опухоли и метастазов (10 % против 27 %). Проведение стандартной химиотерапии (фторпиримидины, оксалиплатин, иринотекан) также определяло увеличение числа случаев дискордантности по статусу генов (14 % при отсутствии химиотерапии, 31 и 30 % после проведения 1-й и 2-й линий соответственно). По сравнению с первичной опухолью частота мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* увеличивалась после проведения химиотерапии, а также соответственно по нарастающей в метастазах в легкие, по брюшине, в головной мозг, кости. Позже были выявлены значимые различия в частоте амплификаций генов между первичной опухолью и метастазами [37]. Ранее эта же группа авторов обнаружила, что проведение адъювантной химиотерапии с включением оксалиплатина после удаления первичной опухоли ассоциировано со значимым увеличением (≥ 1) частоты мутаций в метастазах в печень по сравнению с пациентами, которым адъювантная химиотерапия не выполнялась (57 % против 32 %) [38]. Во 2-м исследовании, проведенном D.M. Graham и соавт., у 15 больных с гистологическим материалом первичной опухоли и метастазов определили статус генов *TP53*, *APC*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* и *PIK3CA*. Авторы отметили, что в случае проведения химиотерапии частота выявления мутантных аллелей в метастазах возрастала на 139 % по сравнению с материалом первичной опухоли [39].

Таким образом, на основе данных представленных 2 исследований, если мы имеем дело с пациентом, которому уже провели химиотерапию, возникает вопрос: определять статус генов необходимо не в первичной опухоли, а в метастазе? Также перспективным видится

определение мутаций циркулирующей в крови опухолевой ДНК (цДНК), что, возможно, поможет выявлять резистентный к лечению клон опухоли и подбирать соответствующий противоопухолевый препарат.

В оригинальном и простом исследовании M. Russo и соавт. с помощью секвенирования нового поколения панели из 250 генов изучили динамику молекулярных изменений в биоптатах опухолевых очагов и цДНК у 1 пациента в процессе терапии метастатического РТК. В первичной опухоли, а также в удаленном метастазе печени у больного был обнаружен дикий тип генов *KRAS* и *NRAS* и мутация в гене *TP53*, при прогрессировании (появлении новых очагов в печени) пациенту была назначена комбинация фторпиримидинов, иринотекана и цетуксимаба. Через 15 мес выявлено дальнейшее прогрессирование. По данным биопсии 1 очага обнаружена мутация в гене *MEK1 p.K57T*, определяющая нечувствительность опухоли к анти-EGFR-воздействию, однако эти изменения преодолеваются путем совместного назначения анти-EGFR-антител с ингибитором MEK (по данным предклинических экспериментов). Пациенту была начата терапия панитумумабом и траметинибом, и действительно, данный очаг уменьшился в размерах, однако другие очаги вторичного роста продолжали увеличиваться. При изучении цДНК также были подтверждены мутация в гене *TP53* и появление мутации в гене *MEK1 p.K57T*. Однако при прогрессировании в режиме приема панитумумаба с траметинибом отмечена мутация в гене *KRAS p.Q61H*, которая не была выявлена в ответившем на лечение очаге. По данным биопсии прогрессирующего метастаза также была обнаружена мутация в гене *KRAS p.Q61H*. Эти находки подтверждают недостаточность анализа биопсии 1 метастаза для определения дальнейшего лечения. Изучение изменений цДНК в крови пациента позволило получить информацию о молекулярных изменениях во всех очагах опухоли [40].

Следует отметить, что, как правило, та или иная мутация, определяющая резистентность к проводимой терапии, не появляется *de novo* в процессе этого лечения, а предсуществует в одном из опухолевых клонов. Так, в 2012 г. была опубликована работа, в которой путем математического моделирования и клинических данных доказывалось на примере развития резистентности к панитумумабу у больных метастатическим РТК, что эта резистентность определяется в сотнях клеток в различных метастазах еще до начала терапии анти-EGFR-антителом [41]. В процессе терапии популяция этих клеток увеличивается, что в дальнейшем приводит к клинически подтвержденному прогрессированию заболевания. Аналогичные данные были получены и при математическом моделировании в работе I. Bozic и M.A. Nowak [42]. Такие находки приводят исследователей к мысли о необходимости применения комбинации различных таргетных препаратов в целях перекрытия всего спектра клинически значимых молекулярных

Конкордантность мутационных изменений в генах между первичной опухолью и метастазами рака толстой кишки

Исследование	Число пациен-тов	Локализация метастаза	Ген	Первичная опухоль	Метастаз	Конкордант-ность, %
I. Albanese [7]	30	Печень	<i>KRAS p53</i>	14/30	13/30	70 90
P. Zauber [8]	42 39	Печень	<i>KRAS APC (LOH)</i>	22/42 —	22/42 —	100 100
M. Etienne-Grimaldi [9]	48	Печень	<i>KRAS</i>	16/48	16/48	100
F. Loupakis [10]	43	Печень	<i>KRAS</i>	17/43	19/43	95
C. Oliveira [17]	28	Лимфатические узлы	<i>KRAS BRAF</i>	18/28 7/28	23/28 10/28	67,8 89,3
F. Al-Mulla [20]	26 31	Лимфатические узлы Печень	<i>KRAS</i>	10/26	11/26	81 81
L. Losi [21, 56]	35	Печень, локальные рецидивы	<i>KRAS</i>	13/16	13/16	100
N. Klijn [22]	305 25	Печень Лимфатические узлы	<i>KRAS</i>	108/305	104/305	96,4 80,0
B. Mostert [26]	26	ЦОК	<i>KRAS</i>	9/26	5/26	76,9
B. Mostert [26]	42	Различная	<i>KRAS</i>	9/42	10/42	78,6
C. Gasch [27]	5	ЦОК	<i>KRAS</i>	5/5	1/5	55,5
C. Schafroth [28]	13	Печень	<i>BRAF</i>	—	—	100
J.S. Vermaat [34]	21	Печень	<i>KRAS EGFR HRAS PIK3CA FLT1 NRAS BRAF TP53</i>	5/21 — — 0/21 — 1/21 0/21 —	6/21 — — 0/21 — 1/21 0/21 —	48 14 76 100 90 100 100 —
S. Kopetz [37]	107	Различная	<i>KRAS APC BRAF NRAS TP53 SMAD PIK3CA</i>	60/107 19 5 5 50 10 21	55/107 21 6 6 53 13 21	89 85 83 83 82 71 53
S. Oltedal [44]	91	Сигнальный лимфати-ческий узел	<i>KRAS</i>	0/91	7/91	80
S.D. Finkelstein [57]	23	Лимфатические узлы	<i>KRAS</i>	12/23	12/23	100
W.V. Kastrinakis [58]	18	Печень	<i>TP53</i>	—	—	100
J.S. Zhang [59]	40	Лимфатические узлы	<i>TP53</i>	—	—	86
S.E. Baldus [16]	20	Различная локализа-ция, за исключением лимфатических узлов	<i>KRAS BRAF PIK3CA</i>	9/20 1/20 3/20	8/20 1/20 4/20	95 100 95
S.E. Baldus [16]	55	Лимфатические узлы	<i>KRAS BRAF PIK3CA</i>	29/55 2/55 8/55	16/55 1/55 13/55	69 96 87
D. Santini [60]	99	Печень (80), легкое (7), другое (12)	<i>KRAS</i>	38/99	36/99	96
S. Artale [61]	48	Различная	<i>KRAS BRAF</i>	11/48 2/48	12/48 1/48	94 98
J.J. Oudejans [62]	31	Различная	<i>KRAS</i>	12/31	14/31	87

Продолжение таблицы

Исследование	Число пациентов	Локализация метастаза	Ген	Первичная опухоль	Метастаз	Конкордантность, %
B. Suchy [63]	66	Различная	<i>KRAS</i>	14/66	14/66	100
S. Tortola [64]	14 (с мутацией в гене <i>KRAS</i>)	Костный мозг	<i>KRAS</i>	14/14	3/14	21,4
F. Molinari [65]	37	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> (ampl) <i>PTEN</i> (ИГХ)	16/37 2/36 — —	15/37 2/36 — —	92 100 67 89
A. Italiano [66]	59	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i>	24/59 1/48	25/59 2/48	95 98
U. Miglio [67]	45	Различная	<i>KRAS</i>	17/45	17/45	100
P. Cejas [68]	93 17	Печень Легкие	<i>KRAS</i>	37/110	40/110	95 88
P. Cejas [69]	117 69 63	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	45/117 1/70 5/70	49/117 1/70 7/70	91 100 94
F. Perrone [70]	10	Различная	<i>KRAS</i>	2/10	2/10	80
K.L. Garm Spindler [71]	31	Различная	<i>KRAS</i>	9/31	7/31	94
J.C. Weber [72]	36	Печень	<i>KRAS</i>	14/36	14/36	100
S. Gattenlohner [73]	106	Различная	<i>KRAS</i>	42/106	41/106	99
S. Gattenlohner [73]	21	Различная (после анти-EGFR)	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i>	—	—	95 100
Y. Kawamoto [74]	24	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	16/24 1/24 0/24 2/24	16/24 1/24 0/24 2/24	100 100 100 100
P. Paliogiannis [75]	31	Различная	<i>KRAS</i>	9/31	8/31	90,3
J.H. Park [76]	17	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i>	5/17	5/17	76 90
T. Watanabe [77]	43	Различная	<i>KRAS</i>	15/43	17/43	88,4
P. Mariani [78]	38	Различная	<i>KRAS</i>	20/38	21/38	97
I.M. Løes [79]	94	Печень	<i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	— — — —	— — — —	89,4 — — —
D. Tougeron [80]	23	Различная (после прогрессирования на анти-EGFR)	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>EGFR</i> (S492R)	0/23 0/23 —	1/23 0/23 —	95,6 100 100
C. Montagut [81]	10	Различная (после прогрессирования на анти-EGFR)	<i>EGFR</i> (S492R)	—	—	80
H. Kawamata [82]	43	Печень	<i>KRAS</i>	12/43	14/43	81,4
O. Dócs [83]	18	Различная	<i>KRAS</i>	—	—	66,7
S. Vignot [84]	13	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i>	7/13 0/13	7/13 0/13	100 100
E. Vakiani [85]	84 31 31 31 31	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i>	41/84 1/84 4/84 15/84 33/84	42/84 1/84 4/84 15/84 37/84	97,6 100 100 100 96,7

Окончание таблицы

Исследование	Число пациен-тов	Локализация метастаза	Ген	Первичная опухоль	Метастаз	Конкордант-ность, %
A.R. Brannon [86]	69	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	38/69 2/69 3/69 14/69	38/69 2/69 3/69 13/69	100 100 100 92,7
Q. He [87]	59	Различная	<i>KRAS</i> <i>PIK3CA</i>	10/59 26/59	11/59 32/59	76,3 42,4
Z.Z. Li [88]	58 10 10 10	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	15/58 1/10 0/10 2/10	18/58 0/10 2/10 2/10	81 90 96,5 100
B. Kleist [89]	42 43 42 42 42	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i>	25/42 1/42 1/42 0/42 1/42	26/42 1/42 0/42 0/42 1/42	83 100 98 100 100
B. Kleist [89]	109	Лимфатические узлы	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>TP53</i>	47/109 5/109 15/109 8/109 19/109	56/109 6/109 14/109 12/109 14/109	88 99 99 96 96
J.S. Thebo [90]	20	Лимфатические узлы	<i>KRAS</i>	20/20	16/20	80
C.C. Schimanski [91]	22	Печень	<i>KRAS</i>	21/22	22/22	95
Y. Kaneko [92]	90	Печень	<i>KRAS</i>	31/90	28/90	90
C. Bossard [93]	18	Различная	<i>KRAS</i>	11/18	13/18	77,8
F. Fabbri [94]	21	ЦОК	<i>KRAS</i>	9/16	3/16	50
M.J. Kim [95]	37 106 143	Легкие Различная Все	<i>KRAS</i>	62/143 — —	63/143 — —	87,7 67,6 82,5
S. Lee [96]	15	Печень	<i>KRAS</i>	5/15	4/15	80
A. Sood [97]	51	Различная	<i>PTEN</i> (ИГХ)	—	—	47
F. Negri [98]	20	Различная	<i>PTEN</i> (ИГХ)	—	—	73
H.B. Xian [99]	72	Печень	<i>KRAS</i>	24/72	23/72	93,1
A. Voutsina [100]	83	Различная	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	32/83 — 11/83	27/83 — 11/83	94 100 93
A. Murata [101]	26	Печень Лимфатические узлы	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i> <i>MSI</i>	6/26 0/26 7/26 3/26	6/26 0/26 7/26 4/26	92,3 100 88,0 97
J. Tie [102]	97	Различная	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>PIK3CA</i>	39/97 8/97 2/97 10/97	43/97 9/97 2/97 14/97	91,8 99 100 95,9
E. Melucci [103]	62	Различная	<i>KRAS</i>	—	—	93,5
Y.Q. Shen [104]	20	Лимфатические узлы Различная	<i>KRAS</i>	6/20	4/20 6/20	90 85
E.A. Siyar [105]	31	Различная	<i>KRAS</i>	13/21	13/31	78

Примечание. ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки; ИГХ — иммуногистохимическое исследование.

нарушений в опухоли уже на 1-й линии терапии [43]. При дополнительном изучении случаев расхождения мутационного статуса гена *KRAS* в первичной опухоли и метастазах генетический анализ в клетках с дополнительных срезов первичной опухоли позволял выявить клоны клеток с мутациями в гене *KRAS* [44].

В итоге если мы принимаем, что опухоль изначально гетерогенна по различным мутационным изменениям, то и прогрессирование заболевания следует рассматривать не как последовательный процесс, а как параллельное развитие первичной опухоли и метастазирования [20, 45]. Это подтверждается наличием различий в мутационном статусе генов (драйверных мутаций) между первичной опухолью и метастазами. Соответственно, для возникновения метастазов не требуется тот же набор мутационных изменений, который необходим для роста первичной опухоли [46].

Внутриопухолевая гетерогенность проявляется не только в различии в мутационном статусе, но и в экспрессии неизмененных генов. Так, при иммуногистохимическом исследовании 6 белков (*MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *MUC5B* и *MUC6*) в клетках по периферии и в центре первичной опухоли и метастазов РТК в печень, полученных от 11 больных, исследователи обнаружили, что экспрессия *MUC1* и *MUC2* не различалась между первичной опухолью и метастазами. Тогда как для экспрессии других белков была характерна выраженная внутриопухолевая гетерогенность как между метастазами, так и внутри первичной опухоли. У 36 % больных выявлена зональная экспрессия муцина в опухоли. Чаще отмечалось снижение экспрессии муцина в клетках метастазов, что может свидетельствовать о снижении степени дифференцировки. При этом у 18 % больных наблюдалось

расхождение по мутационному статусу в гене *CTNNB1* при сравнении отдельных зон 1 опухолевого очага. Также у 18 % больных отмечены молекулярные отличия в генах *KRAS* и *TP53* при сравнении первичной опухоли и метастазов [47]. В другом исследовании данные находки в отношении зональности экспрессии муцина в опухоли не выявлены, что, возможно, объясняется недостаточным количеством опухолевых блоков, вошедших в анализ от 1 больного [48]. Также отмечено, что клетки метастазов РТК в ЛУ чаще показывают диффузную экспрессию p53, а клетки первичной опухоли – с-тус [49].

Следовательно, по результатам современных исследований для опухолей, в том числе РТК, характерна гетерогенность [50–53], а проводимое лечение за счет выживания резистентного клеточного клона определяет явления субклональной эволюции на клеточном уровне [41, 54, 55].

Таким образом, при отборе пациентов с синхронными метастазами в печень отмечается высокая частота соответствия мутационного статуса генов. Однако дискордантность по мутационному статусу даже при синхронно возникающих метастазах выявляется при изучении очагов в ЛУ. Проведение системной терапии также приводит к отбору определенных опухолевых клонов, что может увеличить частоту случаев дискордантности между первичной опухолью и метастазами. Возможно, что и биопсия 1 метастатического очага из нескольких, особенно в процессе специфического лечения, не будет отражать всей молекулярной картины гетерогенных опухолевых клонов. Это может определить неэффективность индивидуально подобранной таргетной терапии на основе только генетических изменений, полученных из 1 опухолевого образца.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Al-Mulla F., Keith W.N., Pickford I.R. et al. Comparative genomic hybridization analysis of primary colorectal carcinomas and their synchronous metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24(4):306–14.
2. Paredes-Zaghlul A., Kang J.J., Essig Y.P. et al. Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clin Cancer Res* 1998;4(4):879–86.
3. Korn W.M., Yasutake T., Kuo W.L. et al. Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(2):82–90.
4. Blaker H., Graf M., Rieker R.J., Otto H.F. Comparison of losses of heterozygosity and replication errors in primary colorectal carcinomas and corresponding liver metastases. *J Pathol* 1999;188(3):258–62.
5. Munoz-Bellvis L., Fontanillo C., Gonzalez-Gonzalez M. et al. Unique genetic profile of sporadic colorectal cancer liver metastasis versus primary tumors as defined by high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Mod Pathol* 2012;25(4):590–601.
6. Bruin S.C., de Ronde J.J., Wiering B. et al. Selection of patients for hepatic surgery of colorectal cancer liver metastasis based on genomic aberrations. *Ann Surg Oncol* 2013;(Suppl 3):560–9.
7. Albanese I., Scibetta A.G., Migliavacca M. et al. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(3):784–91.
8. Zauber P., Sabbath-Solitare M., Marotta S.P., Bishop D.T. Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas. *Mol Pathol* 2003;56(3):137–40.
9. Etienne-Grimaldi M.C., Formento J.L., Francoal M. et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4830–5.
10. Loupakis F., Pollina L., Stasi I. et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(16):2622–9.
11. Scartozzi M., Bearzi I., Berardi R. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression

- in related metastatic sites: Implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2004;22:4772–8.
12. Scartozzi M., Bearzi I., Berardi R. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: Optimising EGFR-targeted treatment options. *Br J Cancer* 2007; 97(1):92–7.
 13. Scartozzi M., Giampieri R., Maccaroni E. et al. Phosphorylated AKT and MAPK expression in primary tumours and in corresponding metastases and clinical outcome in colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. *J Transl Med* 2012;10:71.
 14. Italiano A., Saint-Paul M.C., Caroli-Bosc F.X. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Oncol* 2005;16(9):1503–7.
 15. Bibeau F., Boissiere-Michot F., Sabourin J.C. et al. Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in primary colorectal carcinomas and their related metastases on tissue sections and tissue microarray. *Virchows Arch* 2006;449(3):281–7.
 16. Baldus S.E., Schaefer K.L., Engers R. et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):790–9.
 17. Oliveira C., Velho S., Moutinho C. et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 2007;26(1):158–63.
 18. Baldus S.E., Schaefer K.L., Engers R. et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):790–9.
 19. Giaretti W., Monaco R., Pujic N. et al. Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol* 1996;149(1): 237–45.
 20. Al-Mulla F., Going J.J., Sowden E.T. et al. Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. *J Pathol* 1998;185(2):130–8.
 21. Losi L., Baisse B., Bouzourene H., Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 2005;26(5):916–22.
 22. Knijn N., Mekenkamp L.J., Klomp M. et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2011;104(6):1020–6.
 23. Gonzalez de Castro D., Angulo B., Gomez B. et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer* 2012;107(2):345–51.
 24. Tougeron D., Lecomte T., Pagès J.C. et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2013;24(5):1267–73.
 25. Baas J.M., Krens L.L., Guchelaar H.J. et al. Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *Oncologist* 2011;16(9):1239–49.
 26. Mostert B., Jiang Y., Sieuwerts A.M. et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer* 2013;133(1):130–41.
 27. Gasch C., Bauernhofer T., Pichler M. et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem* 2013;59(1):252–60.
 28. Schafroth C., Galván J.A., Centeno I. et al. VE1 immunohistochemistry predicts BRAF V600E mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget* 2015;6(39):41453–63.
 29. Bettington M., Walker N., Clouston A. et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013;62(3):367–86.
 30. Lundberg I.V., Löfgren Burström A., Edin S. et al. SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS One* 2014;9(7):e101957.
 31. Xie T., Cho Y.B., Wang K. et al. Patterns of somatic alterations between matched primary and metastatic colorectal tumors characterized by whole-genome sequencing. *Genomics* 2014;104(4): 234–41.
 32. Lim B., Mun J., Kim J.H. et al. Genome-wide mutation profiles of colorectal tumors and associated liver metastases at the exome and transcriptome levels. *Oncotarget* 2015;6(26):22179–90.
 33. Tan I.B., Malik S., Ramnarayanan K. et al. High-depth sequencing of over 750 genes supports linear progression of primary tumors and metastases in most patients with liver-limited metastatic colorectal cancer. *Genome Biol* 2015;16:32.
 34. Vermaat J.S., Nijman I.J., Koudijs M.J. et al. Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):688–99.
 35. Han C.B., Li F., Ma J.T., Zou H.W. Concordant KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer tissue specimens: a meta-analysis and systematic review. *Cancer Invest* 2012;30(10):741–7.
 36. Mao C., Wu X.Y., Yang Z.Y. et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep* 2015;5:8065.
 37. Morris V., Kopetz S. Clinical biomarkers in colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2013;11(12):768–76.
 38. Andreou A., Kopetz S., Maru D.M. et al. Adjuvant chemotherapy with FOLFOX for primary colorectal cancer is associated with increased somatic gene mutations and inferior survival in patients undergoing hepatectomy for metachronous liver metastases. *Ann Surg* 2012;256(4):642–50.
 39. Graham D.M., Arseneault M., Sukhai M.A. et al. Analysis of clonal evolution in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:5s(suppl; abstr 3510).
 40. Russo M., Siravegna G., Blaszkowsky L.S. et al. Tumor heterogeneity and lesion-specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2016;6(2):147–53.
 41. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40.
 42. Bozic I., Nowak M.A. Timing and heterogeneity of mutations associated with drug resistance in metastatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(45):15964–8.
 43. Leder K., Foo J., Skaggs B. et al. Fitness conferred by BCR-ABL kinase domain mutations determines the risk of pre-existing resistance in chronic myeloid leukemia. *PLoS One* 2011;6(11):e27682.
 44. Olteidal S., Aasprong O.G., Møller J.H. et al. Heterogeneous distribution of K-ras mutations in primary colon carcinomas: implications for EGFR-directed therapy. *Int J Colorectal Dis* 2011;26(10):1271–7.
 45. Kang Y., Siegel P.M., Shu W. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;3(6):537–49.
 46. Ramaswamy S., Ross K.N., Lander E.S., Golub T.R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003;33(1):49–54.
 47. Buob D., Fauvel H., Buisine M.P. et al. The complex intratumoral heterogeneity of colon cancer highlighted by laser micro-dissection. *Dig Dis Sci* 2012;57(5):1271–80.
 48. Matsuda K., Masaki T., Watanabe T. et al. Clinical significance of MUC1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2000;30(2):89–94.
 49. Zalata K.R., Elshah M.F., Foda A.A., Shoma A. Genetic dissimilarity between

- primary colorectal carcinomas and their lymph node metastases: ploidy, p53, bcl-2, and c-myc expression — a pilot study. *Tumour Biol* 2015;36(8):6579–84.
50. McGranahan N., Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell* 2015;27(1):15–26.
 51. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
 52. Bettgowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24.
 53. Piotrowska Z., Niederst M.J., Karlovich C.A. et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790 wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2015;5(7):713–22.
 54. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486(404):532–6.
 55. Pao W., Miller V.A., Politi K.A. et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73.
 56. Losi L., Benhattar J., Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A:1115–20.
 57. Finkelstein S.D., Sayegh R., Christensen S. et al. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993;71:3827–38.
 58. Kastrinakis W.V., Ramchurren N., Rieger K.M. et al. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 1995;11(4):647–52.
 59. Zhang J.S., Caplin S., Bosman F.T., Benhattar J. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastasis. *Int J Cancer* 1997;70(6):674–8.
 60. Santini D., Loupakis F., Vincenzi B. et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008;13(12):1270–5.
 61. Artale S., Sartore-Bianchi A., Veronese S.M. et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4217–9.
 62. Oudejans J.J., Slebos R.J., Zoetmulder F.A. et al. Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer with metastases to either lung or liver. *Int J Cancer* 1991;49(6):875–9.
 63. Suchy B., Zietz C., Rabes H.M. K-ras point mutations in human colorectal carcinomas: Relation to aneuploidy and metastasis. *Int J Cancer* 1992;52(1):30–3.
 64. Tortola S., Steinert R., Hantschick M. et al. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(11):2837–43.
 65. Molinari F., Martin V., Saletti P. et al. Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant. *Br J Cancer* 2009;100(7):1087–94.
 66. Italiano A., Hostein I., Soubeyran I. et al. KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol* 2010;17(5):1429–34.
 67. Miglio U., Mezzapelle R., Paganotti A. et al. Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay. *Pathol Res Pract* 2013;209(4):233–6.
 68. Cejas P., Lopez-Gomez M., Aguayo C. et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metastases: a potential role in prediction of lung metastasis. *PLoS One* 2009;4(12):e8199.
 69. Cejas P., López-Gómez M., Aguayo C. et al. Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2012;12(2):124–31.
 70. Perrone F., Lampis A., Orsenigo M. et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2009;20(1):84–90.
 71. Garm Spindler K.L., Pallisgaard N., Rasmussen A.A. et al. The importance of KRAS mutations and EGF61A4G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20(5):879–84.
 72. Weber J.C., Meyer N., Pencreach E. et al. Allelotyping analyses of synchronous primary and metastasis CIN colon cancers identified different subtypes. *Int J Cancer* 2007;20(3):524–32.
 73. Gattenlohner S., Etschmann B., Kunzmann V. et al. Concordance of KRAS/BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer before and after anti-EGFR therapy. *J Oncol* 2009;831626.
 74. Kawamoto Y., Tsuchihara K., Yoshino T. et al. KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012;107(2):340–4.
 75. Paliogiannis P., Cossu A., Tanda F. et al. KRAS mutational concordance between primary and metastatic colorectal adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2014;8(4):1422–6.
 76. Park J.H., Han S.W., Oh D.Y. et al. Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;68(4):1045–55.
 77. Watanabe T., Kobunai T., Yamamoto Y. et al. Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2011;54(9):1170–8.
 78. Mariani P., Lae M., Degeorges A. et al. Concordant analysis of KRAS status in primary colon carcinoma and matched metastasis. *Anticancer Res* 2010;30(10):4229–35.
 79. Løes I.M., Immervoll H., Sorbye H. et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA, TP53 status and intraindividual mutation heterogeneity on outcome after liver resection for colorectal cancer metastases. *Int J Cancer* 2016;139(3):647–56.
 80. Tougeron D., Cortes U., Ferru A. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and KRAS mutations during chemotherapy plus anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;72(2):397–403.
 81. Montagut C., Dalmases A., Bellosillo B. et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* 2012;18(2):221–223.
 82. Kawamata H., Yamashita K., Kojo K. et al. Discrepancies between the K-ras mutational status of primary colorectal cancers and corresponding liver metastases are found in codon 13. *Genomics* 2015;106(2):71–5.
 83. Dócs O., Fazakas F., Horváth N.L. et al. Changes of KRAS exon 2 codon 12/13 mutation status in recurrent colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2015;21(2):399–404.
 84. Vignot S., Lefebvre C., Frampton G.M. et al. Comparative analysis of primary tumour and matched metastases in colorectal cancer patients: evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. *Eur J Cancer* 2015;51(7):791–9.
 85. Vakiani E., Janakiraman M., Shen R., et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal

- carcinomas. *J Clin Oncol* 2012;30(24):2956–62.
86. Brannon A.R., Vakiani E., Sylvester B.E. et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol* 2014;15(8):454.
 87. He Q., Xu Q., Wu W. et al. Comparison of KRAS and PIK3CA gene status between primary tumors and paired metastases in colorectal cancer. *Onco Targets Ther* 2016;9:2329–35.
 88. Li Z.Z., Bai L., Wang F. et al. Comparison of KRAS mutation status between primary tumor and metastasis in Chinese colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2016;33(7):71.
 89. Kleist B., Kempa M., Novy M. et al. Comparison of neuroendocrine differentiation and KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/TP53 mutation status in primary and metastatic colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(9):5927–39.
 90. Thebo J.S., Senagore A.J., Reinhold D.S., Stapleton S.R. Molecular staging of colorectal cancer: K-ras mutation analysis of lymph nodes upstages Dukes B patients. *Dis Colon Rectum* 2000;43(2):155–9.
 91. Schimanski C.C., Linnemann U., Berger M.R. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res* 1999;59(20):5169–75.
 92. Kaneko Y., Kuramochi H., Nakajima G. et al. Degraded DNA may induce discordance of KRAS status between primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *Int J Clin Oncol* 2014;19(1):113–20.
 93. Bossard C., K ry S., Jamet P. et al. Delineation of the infrequent mosaicism of KRAS mutational status in metastatic colorectal adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2012;65(5):466–9.
 94. Fabbri F., Carloni S., Zoli W. et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett* 2013;335(1):225–31.
 95. Kim M.J., Lee H.S., Kim J.H. et al. Different metastatic pattern according to the KRAS mutational status and site-specific discordance of KRAS status in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2012;12:347.
 96. Lee S., Haq F., Kim D. et al. Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PLoS One* 2014;5(9):e90459.
 97. Sood A., McClain D., Seetharam R. et al. Beyond KRAS: The quest for novel genetic markers predictive for response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2010;28:15s(suppl; abstr 3567).
 98. Negri F.V., Bozzetti C., Lagrasta C.A. et al. PTEN status in advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Br J Cancer* 2010;102(1):162–4.
 99. Xian H.B., Yu H.B., Zhang J.R. Comparison of the grade of concordance in terms of K-ras status between primaries and related liver metastases in colorectal cancer [article in Chinese]. *Chinese J Cancer Prev Treat* 2010;12:926–9.
 100. Voutsina A., Tzardi M., Kalikaki A. et al. Combined analysis of KRAS and PIK3CA mutations, MET and PTEN expression in primary tumors and corresponding metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2013;26(2):302–13.
 101. Murata A., Baba Y., Watanabe M. et al. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013;109(2):408–15.
 102. Tie J., Lipton L., Desai J. et al. KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):1122–30.
 103. Melucci E., Conti S., Diodoro M.G. et al. Relationship between K-Ras mutational status and EGFR expression evaluated using Allred score in primary and metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:15s(suppl; abstr 3568).
 104. Shen Y.Q., Ye Y.B., Zheng X.W. et al. K-ras mutations in colorectal cancer at different stages. *Tumor* 2010;30:134–7.
 105. Siyar E.A., Demirci U., Cakmak Oksuzoglu B. et al. KRAS discordance between primary and metastatic tumor in patients with metastatic colorectal carcinoma. *J BUON* 2015;20(1):128–35.

Клинико-морфологические особенности нейроэндокринных опухолей: опыт собственных исследований

Г.А. Раскин¹, А.К. Иванова², Р.В. Орлова^{2,3}

¹ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России;
Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., 70;

²СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер»; Россия, 197022 Санкт-Петербург, 2-я Березовая аллея, 3/5;

³медицинский факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»;
Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

Контакты: Григорий Александрович Раскин rasking@list.ru

В настоящее время существует ряд проблем в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей, а также отсутствует общий регистр по данным заболеваниям. В статье освещены основные подходы и проблемы иммуногистохимической диагностики нейроэндокринных опухолей.

Ключевые слова: нейроэндокринная опухоль, индекс пролиферации Ki-67, скинтиграфия с октреотидом, позитронно-эмиссионная томография

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-35-39

Clinical and morphological characteristics of neuroendocrine tumors: clinical experience

G.A. Raskin¹, A.K. Ivanova², R.V. Orlova^{2,3}

¹Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia;
70 Leningradskaya St., Pesochnyy Settlement, Saint-Petersburg 197758, Russia;

²City Clinical Oncological Dispensary; 3/5 2nd Berezhovaya Alleya, Saint-Petersburg 197022, Russia;

³Medical Faculty, Saint-Petersburg State University; 7–9 Universitetskaya St., Saint-Petersburg 199034, Russia

Currently, treatment and diagnostics of neuroendocrine tumors are associated with a number of problems, including absence of a registry for these diseases. The article considers the main approaches and problems of immunohistochemical diagnostics of neuroendocrine tumors.

Key words: neuroendocrine tumor, Ki-67 proliferation index, scintigraphy with octreotide, positron emission tomography

Эпидемиология нейроэндокринных опухолей

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) — гетерогенная группа новообразований, которые могут развиваться в любых органах из клеток диффузной нейроэндокринной системы и состоят из клеток, экспрессирующих основные нейроэндокринные маркеры (синаптофизин и хромогранин А).

Ранее считалось, что НЭО крайне редко встречаются, так как диагностика этой патологии развивалась в условиях отсутствия единой классификации и несоответствия реестра опухолей в различных регионах мира. Наиболее крупные эпидемиологические исследования были проведены в США (программа SEER) и Норвегии (Норвежский реестр рака) с 1973 по 2002 г. Из общего числа проанализированных опухолей (3 122 042 случая) НЭО составили 2,20 %, опухоли дыхательной системы — 65,59 % от всех зарегистрированных НЭО, опухоли пищеварительной системы — 17,18 %. По данным SEER и Норвежского реестра рака на 2008 г., заболеваемость НЭО стремительно растет и увеличилась за последние 30 лет в 5 раз. Точные причины такого роста неизвестны, но могут включать

в себя совершенствование диагностических методов, повышенную онкологическую настороженность (проведение более частых скрининговых обследований), изменение факторов окружающей среды [1].

В настоящее время проблема диагностики и лечения НЭО в России заключается в отсутствии статистических данных о заболеваемости и смертности от этой патологии, недостаточной осведомленности врачей всех специальностей (онколога, хирурга, эндокринолога, гастроэнтеролога) об особенностях диагностики, клинического течения, принципах противоопухолевого лечения и отсутствии возможности или малодоступности иммуногистохимического подтверждения.

С 2012 г. в Городском клиническом онкологическом диспансере г. Санкт-Петербурга начата регистрация НЭО по выполненным иммуногистохимическим исследованиям. Так, в 2012 г. по результатам 934 иммуногистохимических исследований выявлено 13 случаев НЭО (7 случаев НЭО желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и 6 случаев НЭО легкого), в 2013 г. из 1078 исследований — 53 случая НЭО (36 случаев НЭО ЖКТ и 17 НЭО легкого), в 2014 г. из 1055 исследований —

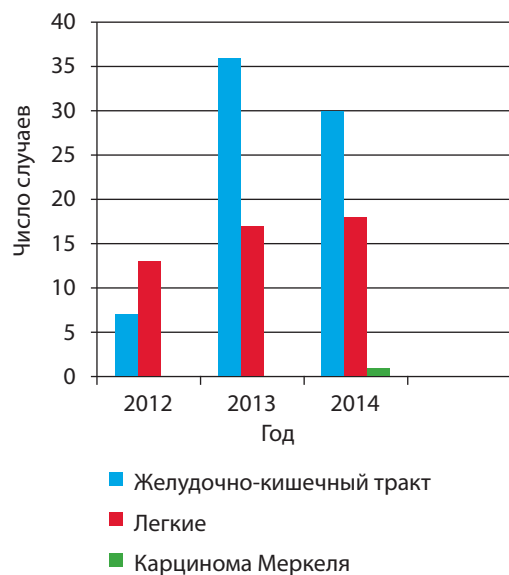


Рис. 1. Выявляемость нейроэндокринных опухолей

49 случаев НЭО (30 случаев НЭО ЖКТ, 18 случаев НЭО легкого и 1 случай карциномы Меркеля) (рис. 1).

Анализируя полученные данные, можно судить о более частой выявляемости НЭО в 2013–2014 гг. по сравнению с 2012 г., что, вероятно, связано с улучшением морфологической диагностики данной опухоли и настороженностью врачей-онкологов.

С апреля 2016 г. в рамках Медицинского общества лечения НЭО на базе Городского клинического онкологического диспансера ведется общий регистр пациентов с НЭО по г. Санкт-Петербургу. В настоящее время наблюдаются 60 больных, из которых 15 (25,00 %) пациентов с НЭО легких, 13 (21,66 %) пациентов с НЭО поджелудочной железы, 10 (16,66 %) пациентов с НЭО без выявленного первичного очага, 8 (13,33 %) пациентов с НЭО желудка, 4 (6,66 %) пациента с НЭО тонкой кишки, 3 (5,00 %) пациента с НЭО предстательной железы, 2 (3,33 %) пациента с НЭО брюшинного пространства, 1 (1,66 %) пациент с НЭО желчного пузыря, 1 (1,66 %) пациент с НЭО аппендикса, 1 (1,66 %) пациент с НЭО ободочной кишки, 1 (1,66 %) пациент с НЭО прямой кишки, 1 (1,66 %) пациент с НЭО яичников (рис. 2).

Основным клиническим признаком у 35 % пациентов является карциноидный синдром, который характеризуется приливами (90 %), диареей (70 %), болями в животе (40 %), поражением сердечных клапанов (40–45 %), телеангиэктазиями (25 %), одышкой (15 %), пеллагрой (5 %). Неспецифичность клинических симптомов часто приводит к поздней диагностике НЭО, средний срок от 1-го обращения пациента за помощью до постановки окончательного диагноза составляет 5–7 лет [2].

Для диагностики НЭО используют следующие специфические методы исследования: скintiграфию с октреотидом (октреоскан), позитронно-эмиссионную



Рис. 2. Распределение по локализациям случаев нейроэндокринных опухолей, выявленных у пациентов в г. Санкт-Петербурге

томографию с ^{68}Ga -DOTATOC-ПЕТ/ПЕТСТ, определение уровня хромогранина А и серотонина в плазме крови, определение 5-ОИУК (5-оксииндолуксусной кислоты) в моче. Однако в силу дороговизны данных исследований они малодоступны в широкой практике и используются в диагностике НЭО только у ограниченного числа пациентов.

Морфологическая диагностика нейроэндокринных опухолей

В настоящее время выделяют 2 основных подхода в морфологической диагностике НЭО: 1) с использованием критериев Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для опухолей ЖКТ [3]; 2) с использованием критериев ВОЗ для опухолей легкого [4].

НЭО ЖКТ. В 1-м подходе классификации НЭО ЖКТ основным фактором для определения степени злокачественности (Grade, G) считается пролиферативный индекс, измеренный по степени экспрессии Ki-67 ($\text{Ki-67} \leq 2 - G_1$, $\text{Ki-67} 3-20 \% - G_2$, $\text{Ki-67} > 20 \% - G_3$). Преимущество данного метода состоит в простоте оценки степени злокачественности с использованием 1 параметра. Однако исследование NORDIC NEC продемонстрировало, что НЭО G_3 представляют собой гетерогенную группу, в которой НЭО с индексом Ki-67 $> 55 \%$ показывают высокий ответ (42 %) на платиносодержащую химиотерапию, в то время как НЭО с индексом Ki-67 $< 55 \%$ значительно реже (14 % случаев) отвечают на химиотерапию [5]. Также имеются противоречия при оценке порога Ki-67 для разделения G_1/G_2 . Ряд исследований показал, что порог в 5 % лучше позволяет выделять прогностически благоприятную группу низкой степени злокачественности [6, 7]. Одной из главных проблем в определении степени злокачественности на основании индекса Ki-67 считается значительная гетерогенность его экспрессии в отдельных случаях (рис. 3). По рекомендациям ВОЗ оценка индекса Ki-67 должна производиться в местах с наивысшей его экспрессией («горячих» точках) [3]. Это приводит к проблеме

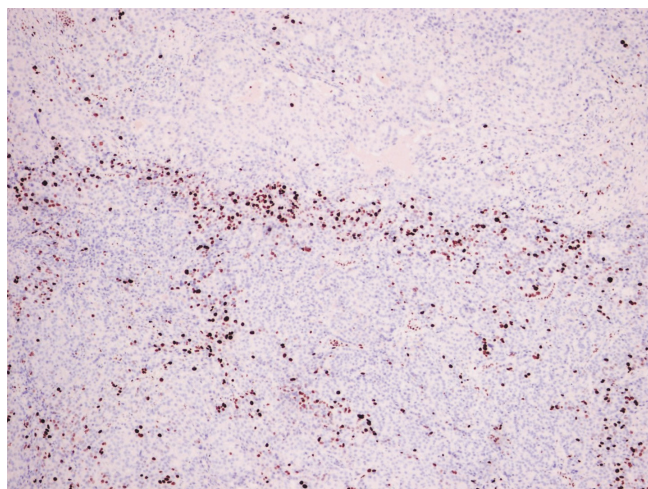


Рис. 3. Значительная гетерогенность экспрессии Ki-67 в нейроэндокринной опухоли ($\times 100$)

оценки индекса Ki-67 на биопсийном материале, так как мы можем получить фрагмент опухоли из зоны с низким индексом.

Несмотря на то что ряд исследований говорит о конкордантности оценки индекса Ki-67 биопсийного и операционного материала [8, 9], мы сталкивались с изменением степени злокачественности в операционном материале по сравнению с биопсийным (в 3 случаях G_2 была изменена на G_3). Если данным пациентам было проведено неoadъювантное лечение, можно столкнуться с неразрешимой проблемой оценки степени злокачественности, так как пролиферативный индекс может меняться под воздействием терапии.

Основанием для постановки диагноза смешанной адено-НЭО ЖКТ является наличие 30 % клеток, экспрессирующих нейроэндокринные маркеры [3]. Однако в различных исследованиях описана экспрессия нейроэндокринных маркеров в 4,5 % клеток аденокарциномы толстой кишки [10], в 15–70 % клеток аденокарциномы желудка [11]. Прогноз у данных пациентов считается хуже, несмотря на то что предиктивное значение нейроэндокринной дифференцировки в аденокарциномах ЖКТ остается неясным.

НЭО легкого. В отличие от НЭО ЖКТ, в определении степени злокачественности нейроэндокринных новообразований легкого Ki-67 хотя и используется в качестве одного из дифференциально-диагностических факторов, но не является основным [2]. Более того, если при типичном карциноиде индекс Ki-67 не должен превышать 5 %, при атипичном карциноиде — 20 %, то нейроэндокринный рак начинается от пролиферативного индекса 40 % [4]. Таким образом, согласно классификации опухолей легкого ВОЗ 2015 г. остается неясным, признаком какой степени злокачественности считается Ki-67 20–40 %. Кроме этого, при НЭО легких необходимо также учитывать митотический индекс и наличие/отсутствие некротических полей. Данная система оценки показывает

низкую воспроизводимость даже среди опытных патологов (каппа Коэна: 0,32) [12].

Как в опухолях ЖКТ, так и в новообразованиях легкого авторы допускают наличие нейроэндокринной дифференцировки в опухолях, не относящихся к НЭО, причем, по данным W. Travis и соавт., в опухолях легкого клиническое значение экспрессии нейроэндокринных маркеров неясно, авторы не рекомендуют выполнять их иммуногистохимическое исследование, если гистологическая картина опухоли не имеет признаков нейроэндокринной морфологии [4]. Особую сложность в ряде случаев представляет дифференциальная диагностика между крупноклеточным нейроэндокринным раком легкого и солидной аденокарциномой с нейроэндокринной дифференцировкой. Это может представлять проблему при оценке экспрессии ALK (anaplastic lymphoma kinase, киназа анапластической лимфомы), так как НЭО часто показывают достаточно интенсивную реакцию на данный белок. Но экспрессия ALK в НЭО происходит не вследствие транслокации или мутации гена, а за счет синтеза нормального белка. Данная нормальная ALK не может выступать мишенью для кризотиниба, и терапия данным препаратом будет неэффективна [13]. Поскольку в России в настоящее время при тестировании на ALK не всегда проводится FISH-исследование, пациенты, у которых вместо НЭО будет ошибочно диагностирован немелкоклеточный рак легкого, могут получить ненужное дорогостоящее лечение.

Нейроэндокринные опухоли редких локализаций на примере молочной железы

Более сложная ситуация в диагностике НЭО так называемых редких локализаций. Так, в последней классификации ВОЗ опухолей молочной железы в наименовании общей группы мы видим карциномы с нейроэндокринными свойствами, а в качестве нозологии имеется инвазивный рак молочной железы с нейроэндокринной дифференцировкой [14]. Причем авторы признают, что до 30 % случаев инвазивного рака неспециального типа и некоторых специальных вариантов имеют экспрессию данных маркеров. В наших исследованиях мы также сталкиваемся с экспрессией нейроэндокринных маркеров при раке молочной железы, иногда достаточно интенсивной (рис. 4). Сложность в установлении нозологии данной опухоли заключалась в том, что, с одной стороны, опухоль интенсивно экспрессировала нейроэндокринные маркеры, а с другой — была негативна по экспрессии Е-кадгерина. По данным одного из исследований 19 случаев нейроэндокринного рака молочной железы, опухолевые клетки в нем всегда экспрессировали Е-кадгерин [15].

В предыдущей классификации опухолей молочной железы в определении нейроэндокринного рака присутствовал критерий экспрессии нейроэндокринных маркеров более чем в 50 % клеток [16], который отсутствовал в последней классификации [14]. Таким

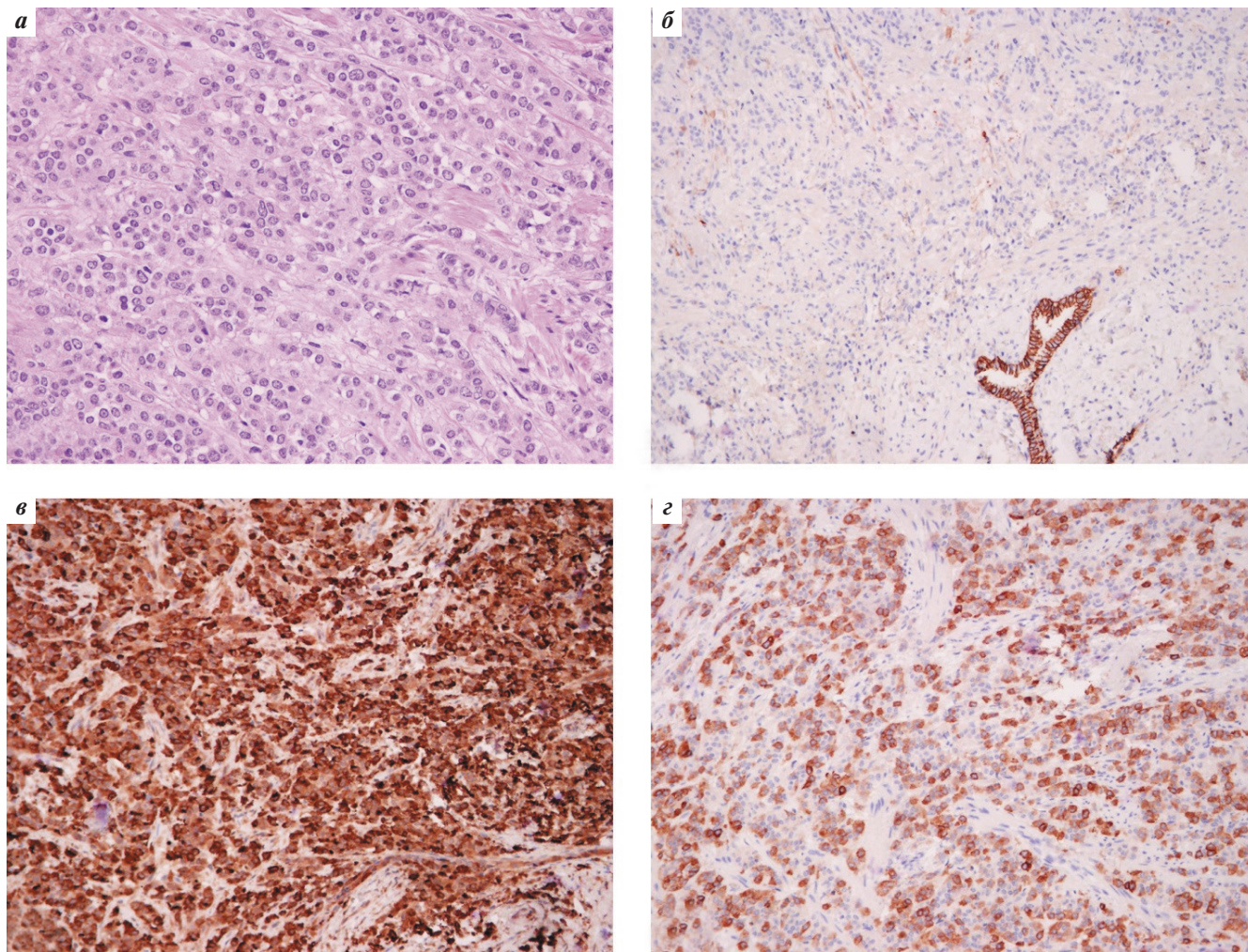


Рис. 4. Метастаз дольчатого рака молочной железы с экспрессией нейроэндокринных маркеров в яичник: а — гематоксилин и эозин ($\times 400$); б — E-кадгерин ($\times 200$); в — маммаглобин ($\times 200$); г — синаптофизин ($\times 200$)

образом, заключение в данном клиническом наблюдении должно звучать как дольчатый рак с нейроэндокринной дифференцировкой. По данным ряда исследований, нейроэндокринная дифференцировка может встречаться в 10–30 % случаев аденокарциномы молочной железы [14, 17]. Наиболее частые формы — муцинозный и папиллярный рак молочной железы, которые примерно в 25 % случаев имеют экспрессию нейроэндокринных маркеров [18]. Прогностическое значение нейроэндокринной дифференцировки при

раке молочной железы неоднозначно, с противоречивыми данными в различных исследованиях [19–21].

Заключение

Таким образом, проблема выявления НЭО сохраняет свою актуальность в России. Нерешенными вопросами остаются определение степени злокачественности НЭО на ограниченном материале, наличие гетерогенности НЭО G₂ и G₃, выявление НЭО редких локализаций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Горбунова В.А. Нейроэндокринные опухоли. Общие принципы диагностики и лечения. М.: Кодекс, 2015. 456 с. [Gorbunova V.A. Neuroendocrine tumors. General principles of diagnostics and treatment. Moscow: Kodeks, 2015. 456 p. (In Russ.)].
2. Симоненко В.Б., Дудин П.А., Маканин М.А. Нейроэндокринные опухоли. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 237 с. [Simonenko V.B., Dudin P.A., Makanin M.A. Neuroendocrine tumors. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 237 p. (In Russ.)].
3. WHO classification of tumors the digestive system. Ed. by F.T. Bosman, F. Carneiro, R.H. Hruban, N.D. Theise. Lyon: IARC Press, 2010.
4. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Ed. by W.D. Travis, E. Brambilla, A.P. Burke et al. Lyon: IARC Press, 2015.
5. Sorbye H., Welin S., Langer S.W. et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): The NORDIC

- NEC study. *Ann Oncol* 2013;24(1): 152–60.
6. Khan S., Luong T.V., Watkins J. et al. A comparison of Ki-67 and mitotic count as prognostic markers for metastatic pancreatic and midgut neuroendocrine neoplasms. *Br J Cancer* 2013;108(9):1838–45.
7. Scarpa A., Mantovani W., Capelli P. et al. Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients. *Mod Pathol* 2010;23(6):824–33.
8. Arco D.D., Pérez D., Medina O. et al. Reliability of Ki-67 determination in FNA samples for grading pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 2016;27(4):276–83.
9. Farrell J.M., Pang J.C., Kim G.E., Tabatabai Z.L. Pancreatic neuroendocrine tumors: accurate grading with Ki-67 index on fine-needle aspiration specimens using the WHO 2010/ENETS criteria. *Cancer Cytopathol* 2014;122(10): 770–8.
10. Kleist B., Poetsch M. Neuroendocrine differentiation: The mysterious fellow of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(41):11740–7.
11. Sentani K., Oue N., Noguchi T. et al. Immunostaining of gastric cancer with neuroendocrine differentiation: Reg IV-positive neuroendocrine cells are associated with gastrin, serotonin, pancreatic polypeptide and somatostatin. *Pathol Int* 2010;60(4):291–7.
12. Swarts D.R., van Suylen R.J., den Bakker M.A. et al. Interobserver variability for the WHO classification of pulmonary carcinoids. *Am J Surg Pathol* 2014;38(10):1429–36.
13. Takeuchi K., Togashi Y., Kamihara Y. et al. Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). *Ann Oncol* 2016;27(1):185–92.
14. WHO classification of tumours of the breast. Ed. by S.R. Lakhani, I.O. Ellis, S.J. Schnitt et al. Lyon: IARC Press, 2012.
15. Gao L.X., Liu G., Li L. et al. Neuroendocrine carcinoma of breast: a study of tumor morphology and subtyping. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2011;40(9):604–9.
16. WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Ed. by F.A. Tavassoli, P. Devilee. Lyon: IARC Press, 2003.
17. Miremadi A., Pinder S.E., Lee A.H. et al. Neuroendocrine differentiation and prognosis in breast adenocarcinoma. *Histopathology* 2002;40(3):215–22.
18. Inno A., Bogina G., Turazza M. et al. Neuroendocrine carcinoma of the breast: current evidence and future perspectives. *Oncologist* 2016;21(1):28–32.
19. Wei B., Ding T., Xing Y. et al. Invasive neuroendocrine carcinoma of the breast: a distinctive subtype of aggressive mammary carcinoma. *Cancer* 2010;116(19):4463–73.
20. Tian Z., Wei B., Tang F. et al. Prognostic significance of tumor grading and staging in mammary carcinomas with neuroendocrine differentiation. *Hum Pathol* 2011;42(8):1169–77.
21. Kwon S.Y., Bae Y.K., Gu M.J. et al. Neuroendocrine differentiation correlates with hormone receptor expression and decreased survival in patients with invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2014;64(5):647–59.

Идентификация маркеров аденокарциномы желудка на основе биоинформатического поиска и анализа генной экспрессии

В.В. Волкоморов^{1,2}, Е.С. Григорьева^{1,2}, Г.В. Краснов³, Н.В. Литвяков^{1,2}, Н.А. Лисицын³,
М.И. Воевода⁴, А.В. Белковец⁴, С.Г. Афанасьев¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;
Россия, 634050 Томск, пр. Ленина, 36;

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

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины»;
Россия, 630089 Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

Контакты: Виктор Владимирович Волкоморов v.volkomorov@gmail.com

Введение. Одна из важных задач современной онкологии — поиск ассоциированных с опухолями молекулярных маркеров, которые могут использоваться для диагностики и прогнозирования рака, оценки степени радикальности операции и последующего лечения, а также раннего выявления рецидивов. Одним из продуктивных вариантов подобного поиска является анализ транскриптомных баз данных с применением методов биоинформатики с последующей валидацией полученных результатов на клиническом материале.

Цель исследования — поиск мембранных белков, которые могут быть использованы для сывороточной диагностики аденокарциномы желудка интестинального гистологического типа.

Материалы и методы. Идентификацию потенциальных маркеров рака желудка (РЖ) проводили с использованием баз данных Gene Ontology и The Cancer Genome Atlas (TCGA). Последующую оценку дифференциальной экспрессии генов выполняли на парных образцах аденокарциномы и нормальной ткани желудка, взятых от 55 пациентов. Экспрессию генов оценивали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени по методу ΔCq .

Результаты. Сравнительный анализ уровней синтеза матричных РНК (мРНК) нормальных и опухолевых тканей с применением нового алгоритма биоинформатического поиска привел к идентификации 3 наиболее высококопийных транскриптов (SULF1, PMEPA1 и SPARC), внутриклеточное содержание которых заметно повышается при РЖ. При анализе уровня мРНК данных генов в клиническом материале наблюдалось более чем двукратное увеличение уровня экспрессии PMEPA1 и SPARC в 75 % образцов РЖ интестинального гистологического типа. В образцах РЖ диффузного гистологического типа этот показатель составил 25 и 38 % соответственно.

Выводы. Использование оригинального биоинформатического подхода, основанного на анализе данных TCGA, позволило выявить 2 гена (PMEPA1 и SPARC), преимущественно экспрессирующихся в опухолях желудка интестинального типа. Полученные результаты свидетельствуют об актуальности дальнейшего исследования роли этих генов в патогенезе РЖ и оценки клинической значимости уровня их экспрессии в опухолевой ткани.

Ключевые слова: аденокарцинома желудка, гистологический тип, гены-маркеры, генетическая база данных, экспрессия генов, PMEPA1, SPARC, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-40-45

Identification of the intestinal type gastric adenocarcinoma transcriptomic markers using bioinformatic and gene expression analysis

V.V. Volkomorov^{1,2}, E.S. Grigor'eva^{1,2}, G.S. Krasnov³, N.V. Litvyakov^{1,2}, N.A. Lisitsyn³,
M.I. Voevoda⁴, A.V. Belkovets⁴, S.G. Afanas'ev¹, N.V. Cherdyntseva^{1,2}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²National Research Tomsk State University; 36 Lenina Prospekt, Tomsk 634050 Russia;

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

⁴Research Institute of Internal and Preventive Medicine; 175/1 B. Bogatkova St., Novosibirsk 630089, Russia

Introduction. Searching for specific and sensitive molecular tumor markers is one of the important tasks of modern oncology. These markers can be used for early tumor diagnosis and prognosis as well as for prediction of therapeutic response, estimation of tumor volume or to assess disease recurrence through monitoring. Gene expression data base mining followed by experimental validation of results obtained is one of the promising approaches for searching of that kind.

Objective: to identify several membrane proteins which can be used for serum diagnosis of intestinal type of gastric adenocarcinoma.

Materials and methods. We used bioinformatic-driven search using Gene Ontology and The Cancer Genome Atlas (TCGA) data to identify mRNA up-regulated in gastric cancer (GC). Then, the expression levels of the mRNAs in 55 pare clinical specimens were investigated using reverse transcription polymerase chain reaction.

Results. Comparative analysis of the mRNA levels in normal and tumor tissues using a new bioinformatics algorithm allowed to identify 3 high-copy transcripts (SULF1, PMEPA1 and SPARC), intracellular content of which markedly increased in GC. Expression analysis of these genes in clinical specimens showed significantly higher mRNA levels of PMEPA1 and SPARC in tumor as compared to normal gastric tissue. Interestingly more than twofold increase in expression level of these genes was observed in 75 % of intestinal-type GC. The same results were found only in 25 and 38 % of diffuse-type GC respectively.

Conclusions. As a result of original bioinformatic analysis using TCGA data base two genes (PMEPA1 and SPARC) were shown to be significantly upregulated in intestinal-type gastric adenocarcinoma. The findings show the importance of further investigation to clarify the clinical value of their expression level in stomach tumors as well as their role in carcinogenesis.

Key words: gastric adenocarcinoma, histological type, genetic markers, gene expression database, gene expression, PMEPA1, SPARC, reverse transcription polymerase chain reaction assay

Введение

Одна из важных задач современной онкологии — поиск ассоциированных с опухолями молекулярных маркеров, которые могут использоваться для диагностики и прогнозирования рака, оценки степени радикальности операции и последующего лечения, а также раннего выявления рецидивов [1]. Для поиска таких маркеров применяются методы, основанные на сравнительном анализе геномов, транскриптомов и протеомов опухолевых и нормальных клеток в целях обнаружения специфических молекулярно-генетических изменений, возникающих в процессе канцерогенеза. Одним из используемых подходов является идентификация генов, уровень транскрипции которых заметно повышается в опухолях, при этом для применения в клинической практике особенно важны случаи, в которых такое повышение коррелирует с клиническими параметрами. Последующие идентификация и анализ активируемых сигнальных путей, обеспечивающих биологическое поведение опухолевых клеток, позволяют выявить потенциальные мишени для противоопухолевой терапии [2, 3].

Используемые в настоящее время транскриптомные методы поиска молекулярных маркеров рака можно подразделить на 2 группы.

- Сравнительный анализ результатов гибридизации тотальной комплементарной ДНК (кДНК) нормальных и опухолевых тканей с коммерчески распространяемыми микрочипами (результаты таких исследований содержит база данных Oncomine). К недостаткам этого подхода можно отнести невозможность оценки уровня транскрипции низкокопийных генов, а также элиминацию сигналов, получаемых в результате перекрестной гибридизации транскриптов гомологичных генов [4].
- Сравнительный анализ результатов высокопроизводительного секвенирования транскриптома опухолевых и нормальных тканей. Идентификация генов, уровень транскрипции которых наиболее заметно и часто различается

в опухолевой и нормальной тканях, требует применения методов биоинформатики [1, 5]. Для последующей валидации результатов биоинформатического поиска в качестве «золотого стандарта» используется метод количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [6, 7].

В настоящем исследовании представлены результаты нахождения маркеров, специфичных для аденокарцином желудка интестинального и диффузного гистологических типов, на основе комплексного биоинформатического поиска и валидации дифференциальной экспрессии выявленных генов в опухолевой и нормальной тканях на клиническом материале больных раком желудка (РЖ). Эти маркеры могут использоваться для сывороточной диагностики с применением разработанного нами ранее формата иммуно-ПЦР [8]. Исследований подобного рода в России практически нет, что указывает на актуальность их проведения, которая подчеркивается фактом наличия популяционных особенностей молекулярных маркеров [9, 10].

Материалы и методы

Биоинформатический поиск. Поиск генов для сывороточной диагностики РЖ проводили в 2 этапа.

На 1-м этапе в базе данных Gene Ontology отбирали гены, кодирующие мембранные белки, а также белки, находящиеся в составе эндосом и образующихся из них экзосом. Поиск осуществляли с использованием ключевых слов: (*extracellular region NOT secreted*) OR (*endosome*).

Второй этап отбора заключался в идентификации генов, экспрессия которых повышается в 2 основных формах РЖ согласно данным RNA-Seq, представленным в базе The Cancer Genome Atlas (TCGA). Анализ проведен с помощью разработанной нами программы CrossHub (статья готовится к печати). Нормирование транскриптомных данных выполняли по усеченному среднему значению относительной экспрессии (ТММ) [11, 12].

При анализе дифференциальной экспрессии производилась оценка 2 параметров:

- распределения числа прочтений (ридов) между 2 пулами образцов (норма—опухоль) с использованием *t*-теста для независимых выборок. Общую дисперсию оценивали как сумму наблюдаемой дисперсии и дисперсии для распределения Пуассона;
- числа прочтений в парных образцах норма—опухоль с использованием *t*-теста для зависимых выборок.

По результатам оценки рассчитывали скоринг-фактор *S*, отражающий величину наблюдаемых изменений экспрессии и их достоверность (false discovery rate, FDR):

$$S = \sum_{i = \text{pools, pairs}} (-1) \text{sign}(\log(FC_i)) \log(FC_i) \log(FDR_i),$$

где FC_{pools} , FC_{pairs} — изменение содержания транскрипта в опухоли по сравнению с нормой при 1-м и 2-м методах расчета соответственно.

Наибольшее значение *S* присваивалось генам, повышенная транскрипция которых выявлялась по обоим критериям оценки: как при сравнении 2 пулов образцов (норма—опухоль), так и при анализе изменений в индивидуальных парных образцах. Достоверность изменений уровней транскрипции (FDR) рассчитывалась с использованием поправки на множественное тестирование Бенджамини—Хохберга [13].

Дополнительными критериями отбора являлись: 1) повышенная транскрипция отобранных генов в других опухолях желудочно-кишечного тракта (раке толстой и прямой кишки); 2) высокое абсолютное значение уровня транскрипции, оцененное по общему числу ридов для опухолевых образцов. Окончательное ранжирование генов *R* проводили исходя из их положения в 4 рейтинг-листах:

$$R = 2P_{\text{stomach}} + P_{\text{rectum}} + P_{\text{colon}} + P_{\text{expr. level}}$$

где *P* — место гена в соответствующем рейтинге.

Как известно, повышение уровня транскрипции определяется 3 основными факторами: влиянием активирующих транскрипционных факторов, гипометилированием промоторных и энхансерных областей, а также модификацией гистонов. Среди 50 топ-генов с наименьшим значением *R* отбирали те, для которых результаты транскриптомного анализа подтверждались результатами исследования гипометилирования промоторных областей в базе TCGA, поскольку анализ профилей метилирования является одним из наиболее информативных способов обнаружения возможных изменений транскрипции. Для этого с помощью программы CrossHub анализировали данные метиломного профилирования 450 тыс. сайтов генома человека, полученные с использованием микрочипов для опухолей желудка и толстой и прямой кишки.

Характеристика пациентов. Для оценки дифференциальной экспрессии генов были использованы парные образцы аденокарциномы и нормальной ткани от 55 (54,5 % мужчин, 45,5 % женщин) больных РЖ (28 — диффузного и 27 — интестинального гистологического типа), получивших лечение в клинике Томского национального исследовательского медицинского центра. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (Указ Президента Российской Федерации от 24.12.1993 № 2288). Получены разрешение этического комитета института и информированные согласия пациентов. Средний возраст больных составил $58,3 \pm 1,5$ года. Первичная опухоль T1–2 была диагностирована у 40 % пациентов (9 случаев диффузного гистологического типа, 13 — интестинального), опухоль T3–4 — у 60 % (19 случаев диффузного гистологического типа, 14 — интестинального); метастазы

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов для оценки экспрессии генов

Наименование гена	GenBank Accession Number		Последовательность	Температура отжига, °C
<i>ACTB</i> (actin beta)	NM_001101.3	F R Probe	5'-gagaagatgaccagatcatgtt-3' 5'-atagcacagcctggatagcaa-3' FAM 5'-agaccttcaacacccagccat-3'BHQ1	60
<i>SPARC</i>	NM_003118.3	F R Probe	5'-atcttcctgtactggcagttc-3' 5'-ctcgggtgtggagaggtacc FAM 5'-cagctggaccagcacccttgac-3'BHQ1	60
<i>SULF1</i>	NM_001128205.1	F R UT-метка	5'-gaaggtgaccaagttcatgctaattgctgggaagcctctgtt-3' 5'-aggcacaagaataatgttggtc-3' FAM 5'-agcgatgcgttcgagcatcgc(dT-BHQ1)gaaggtgaccaagttcatgct	60
<i>PMEPA1</i>	NM_020182.4	F R Probe	5' — tgttccagagcatggagatca-3' 5' — gtgcagacagctttagtg-3' FAM 5'-catcgtgtgtgtgatgatggtgatg-3'BHQ1	60

Примечание. UT-метка (universal primer tag) — универсальный зонд; FAM — флуоресцентный краситель, карбоксифлуоресцеин; BHQ1 — гаситель флуоресценции.

в регионарные лимфатические узлы отмечены у 40 % больных (15 случаев диффузного гистологического типа, 18 — интестинального).

Выделение матричных РНК (мРНК) и синтез кДНК.

Парные образцы опухолей и нормальной ткани желудка получены от пациентов с диагнозом РЖ при оперативном вмешательстве. РНК из замороженного операционного материала выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Германия). Синтез кДНК (с использованием гексамерных праймеров) проводили с применением набора RevertAid™ (Fermentas, Латвия).

Оценка уровня транскрипции генов. Процедуры выделения мРНК, синтеза кДНК и постановки ОТ-ПЦР-РВ описаны ранее [14]. Для нормализации уровней экспрессии использовали контрольный ген *ACTB* [15]. Последовательности праймеров и зондов (FAM—BHQ) подбирали с помощью программы Vector NTI 11.5 с использованием базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (табл. 1).

Для каждого образца кДНК ПЦР проводили в 2 репликах. Уровень содержания транскрипта оценивали по формуле:

$$R = 2^{Ct(\text{ref}) - Ct(\text{targ})}.$$

Статистический анализ уровней транскрипции генов в нормальной и опухолевой тканях проводили с использованием *U*-критерия Манна—Уитни.

Результаты

Алгоритм биоинформатического поиска был направлен на отбор мембранных белков, которые могут быть использованы для сывороточной диагностики РЖ по разработанной нами ранее технологии иммуно-ПЦР [8]. Для этой цели на 1-м этапе биоинформатического поиска отбирали белки, локализованные на внешней стороне плазматической мембраны, а также в составе эндосом. Таким образом, по данным ресурса Gene

Ontology сформирован список из 1983 генов, отвечающих ключевым словам (см. Материалы и методы). Для идентификации генов, уровень транскрипции которых заметно повышается в опухолях желудка по сравнению с нормой, проводили анализ базы данных TCGA, в настоящее время являющейся наиболее информативным ресурсом, объединяющим сведения транскриптомных, экзомных и метиломных исследований более чем для 15 видов рака. Анализ, выполненный с помощью приложения CrossHub, позволил выявить потенциальное повышение экспрессии 130 генов по парным образцам и 155 генов при сравнении пулов образцов нормы и опухоли (FDR < 0,01). Для 39 и 60 генов соответственно уровень экспрессии в опухоли возрастал более чем в 4 раза.

В результате дальнейшего анализа по 4 критериям (расчет *S* для 3 видов рака и оценка абсолютного значения экспрессии при РЖ) был сформирован рейтинг из 50 генов. Дальнейший анализ данных TCGA показал возможное гипометилирование промоторных областей 20 генов: *SULF1*, *COL1A2*, *ESM1*, *COL5A2*, *COL12A1*, *ADAM12*, *COL4A1*, *INHBA*, *VCAN*, *COL3A1*, *KIAA1199*, *COL5A1*, *ACAN*, *PMEPA1*, *SPPI*, *ADAMTS2*, *SPARC*, *MET*, *COL11A1*, *MMP7*. Гены, кодирующие коллагены, из дальнейшего анализа были исключены, а из оставшихся 13 генов были отобраны 3 (*SULF1*, *PMEPA1* и *SPARC*) с наибольшим внутриклеточным содержанием (число ридов 10, 9 и 45 млн соответственно).

Экспрессия отобранных генов оценена в парных клинических образцах нормальной и опухолевой тканей желудка интестинального и диффузного типов с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ (табл. 2). Для гена *SULF1* статистически значимых различий между уровнями генной экспрессии образцов 2 типов не выявлено. Однако для оставшихся 2 генов (*PMEPA1* и *SPARC*) в опухолевых образцах интестинального типа наблюдалось более чем двукратное повышение уровня транскрипции по сравнению с образцами диффузного типа ($p < 0,001$). Так, для гена *PMEPA1*

Таблица 2. Результаты полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией генов, уровень экспрессии которых повышается преимущественно при раке желудка интестинального типа

Тип	Me (Q25–75), %			
	Опухоль	Норма	%*	<i>p</i>
<i>PMEPA1</i>				
Интестинальный	2,8 (1,9; 5,8)	1,1 (0,6; 1,5)	58,3	0,0005
Диффузный	2,5 (1,6; 3,5)	1,94 (1,0; 3,4)	25,0	0,174
<i>SPARC</i>				
Интестинальный	15,6 (10,2; 31,9)	5,0 (4,0; 7,8)	75,0	0,012
Диффузный	21,2 (7,2; 24,8)	8,7 (7,0; 12,4)	38,5	0,191

Примечание. Me (Q25–75) — медиана и интерквартильный размах уровня экспрессии; *p* — уровень значимости, *U*-критерий Манна—Уитни.

*Процент опухолей с более чем двукратным увеличением уровня экспрессии гена.

более чем двукратное повышение уровня экспрессии наблюдалось в 75 % образцов интестинального типа по сравнению с 25 % образцов диффузного, в то время как для гена *SPARC* это соотношение составляло 75 и 38 % соответственно (см. табл. 2). Таким образом, транскрипты генов *PMEPA1* и *SPARC* являются преимущественно маркерами РЖ интестинального типа, что открывает новые возможности в сыровоточной диагностике опухолей желудка.

Обсуждение

Белок *PMEPA1* является трансмембранным, ингибирующим сигнальный путь TGF- β (transforming growth factor beta, трансформирующего фактора роста бета) — полифункционального цитокина, регулирующего процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Ускользание неопластических клеток от ингибирующего действия TGF- β происходит при возникновении большинства эпителиальных опухолей по 2 механизмам. Первый механизм — результат инактивирующих мутаций в генах, кодирующих белки данного пути, а второй — следствие повышения уровня синтеза белков, ингибирующих путь, таких как *PMEPA1*, уровень синтеза которого увеличивается в опухолях легких и молочной железы [10, 16]. Интересно, что после инактивации указанного пути в опухолевых клетках происходит повышение уровня экспрессии гена *TGF- β* . Это может приводить, во-первых, к пролиферации клеток стромы и кровеносных сосудов, во-вторых, к запуску программы эпителиально-мезенхимального перехода, что способствует

образованию мезенхимальных клеток с локомоторным фенотипом, обладающих свойствами стволовых опухолевых клеток и клеток, способных к метастазированию [17, 18].

В данном исследовании также установлена дифференциальная экспрессия гена *SPARC* при интестинальном типе аденокарциномы желудка. Ранее продемонстрировано, что ген *SPARC* кодирует белок внеклеточного матрикса, регулирующий клеточный цикл и смену полярности эпителиальных клеток в процессах инвазии и метастазирования опухолей. Показано, что повышение экспрессии гена *SPARC* в опухолях желудка является прогностическим фактором, указывающим на быстрое прогрессирование заболевания и снижение показателей выживаемости пациентов [3, 19]. В то же время ингибирование активности гена в клеточных линиях РЖ с помощью специфической микроРНК приводит к резкому снижению инвазивного потенциала и активации апоптоза опухолевых клеток [20].

Заключение

Таким образом, в данной работе с использованием оригинального биоинформатического подхода, основанного на анализе данных TCGA, выявлены 2 гена (*PMEPA1* и *SPARC*), преимущественно экспрессирующихся в опухолях желудка интестинального типа. Полученные нами результаты свидетельствуют об актуальности дальнейшего исследования роли этих генов в патогенезе аденокарцином желудка и необходимости проведения оценки их прогностической значимости и возможности использования в качестве мишеней для химиотерапии.

Финансирование

Биоинформатический анализ выполнен при поддержке гранта № 15-04-08731 Российского фонда фундаментальных исследований, экспериментальный анализ — при поддержке гранта № 14-04-31500.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Diamandis E.P. Towards identification of true cancer biomarkers. *BMC Med* 2014;12(1):156.
2. Hu Y., He K., Wang D. et al. *TMEPA1* regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways. *Carcinogenesis* 2013;34(8):1764–72.
3. Jeung H.C., Rha S.Y., Im C.K. et al. A randomized phase 2 study of docetaxel and S-1 versus docetaxel and cisplatin in advanced gastric cancer with an evaluation of *SPARC* expression for personalized. *Cancer* 2011;117(10):2050–7.
4. Ramaswamy S., Tamayo P., Rifkin R. et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(26):15149–54.
5. Букурова Ю.А., Краснов Г.С., Никитина И.Г. и др. Методы поиска маркеров для сыровоточной диагностики опухолей. *Молекулярная биология* 2013;47(1):3–11. [Bukurova Yu.A., Krasnov G.S., Nikitina I.G. et al. Serological diagnosis of tumors: methods of marker's search. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2013;47(1):3–11. (In Russ.)].
6. Kulasingam V., Diamandis E.P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5(10):588–99.
7. Kropotova E.S., Zinov'eva O.L., Zyrianova A.F. et al. Expression of genes involved in retinoic acid biosynthesis in human gastric cancer. *Mol Biol* 2013;47(2):280–92.
8. Никитина И.Г., Сабирова Е.Ю., Солопова О.Н. и др. Новый формат иммуно-ПЦР для сыровоточной диагностики рака толстой кишки. *Молекулярная биология* 2014;48(1):117–23. [Nikitina I.G., Sabirova E.Yu., Solopova O.N. et al. A new immuno-PCR format for serological diagnosis of colon cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2014;48(1):117–23. (In Russ.)].
9. Maconi G., Manes G., Porro G.B. Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14(8):1149–55.
10. Watanabe Y., Itoh S., Goto T. et al. *TMEPA1*, a transmembrane TGF- β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- β signaling. *Mol Cell* 2010;37(1):123–34.

11. Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010;11(10): R106.
12. Bullard J.H., Purdom E., Hansen K.D., Dudoit S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 2010;11:94.
13. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statistic Society, Series B: Methodol* 1995;57:289–300.
14. Volkomorov V., Grigoryeva E., Krasnov G. et al. Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and their gene expression analysis. *Exp Oncol* 2013; 35(1):1–6.
15. Rajkumar T., Vijayalakshmi N., Gopal G. et al. Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 2010;10:45.
16. Sharad S., Ravindranath L., Haffner M.C. et al. Methylation of the PMEPA1 gene, a negative regulator of the androgen receptor in prostate cancer. *Epigenetics* 2014;9(6):918–27.
17. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96.
18. Arvelo F., Sojo F., Cotte C. Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicalscience* 2016;10:617.
19. Sato T., Oshima T., Yamamoto N. et al. Clinical significance of SPARC gene expression in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol* 2013;108(6):364–8.
20. Yin J., Chen G., Liu Y. et al. Downregulation of SPARC expression decreases gastric cancer cellular invasion and survival. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:59.

Выявление мутаций в «горячих» участках генома: ампликоны-«шпильки» в методе плавления ДНК

В.Н. Кондратова, И.В. Ботезату, В.П. Шелепов, А.В. Лихтенштейн

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Владимирович Лихтенштейн alicht@mail.ru

Амплификация с последующим плавлением ДНК с зондами TaqMan эффективно выявляет мутации в «горячих» участках генома. Однако необходимость проводить полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в асимметричном варианте обуславливает ряд ограничений этого метода: 1) невозможность количественного анализа из-за снижения эффективности амплификации; 2) необходимость выполнения 2 независимых ПЦР для выявления мутаций в комплементарных нитях ампликона; 3) усложнение дизайна ПЦР. Преодоление этих ограничений оказалось возможным при использовании в симметричной ПЦР комбинированных праймеров, состоящих из универсальной и специфической последовательностей: образующиеся в результате одностранные «шпильчатые» (hairpin) ампликоны (sense и antisense) не способны ренатурировать друг с другом, но независимо гибридизуются с присутствующими в среде зондами TaqMan (antisense и sense соответственно). Разработанный способ позволяет в одном тесте получить количественные (число копий) и качественные (наличие мутаций в обеих нитях ампликона) характеристики исследуемого участка ДНК.

Ключевые слова: сканирование мутаций, плавление ДНК, зонды TaqMan, KRAS, «шпильчатые» ампликоны

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-46-52

Detection of gene mutations in genome “hot” spots: “hairpin” amplicons in DNA melting analysis

V.N. Kondratova, I.V. Botezatu, V.P. Sheleпов, A.V. Lichtenstein

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Polymerase chain reaction (PCR) followed by DNA melting analysis with TaqMan probes effectively reveals mutations in the human genome “hot” spots. The necessity to carry out PCR in the asymmetric variant causes, however, a number of restrictions of this method: 1) an inability of quantitative estimates of gene copy numbers; 2) the need for 2 independent PCR tests for detection of mutations in both complementary strands of an amplicon (this approach improves reliability and sensitivity of the analysis); 3) the complication of PCR design and decrease in efficiency of amplification. Overcoming these restrictions was possible by means of symmetric PCR with primers containing the specific and universal sequences: the single-stranded “hairpins” (sense and antisense) are not capable to anneal with each other, but they can hybridize independently with 2 TaqMan probes present in the reaction mixture. The proposed approach allows quantitative and qualitative characterization of a DNA sample (the copy number estimates as well as mutation scanning of both complementary amplicon strands).

Key words: mutation scanning, DNA melting analysis, TaqMan probes, KRAS, “hairpin” amplicons

Введение

Таргетная терапия онкологических заболеваний основана на предварительных исследованиях ключевых для определенной формы рака молекулярных показателей, в качестве которых наиболее часто выступают дефекты протоонкогенов и генов-супрессоров. Один из наиболее значимых объектов генодиагностики — онкоген *KRAS*, мутации которого в кодонах 12, 13 и 61 встречаются в ~ 40 % случаев рака толстой кишки [1] и прогнозируют негативный ответ на терапию анти-EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермального фактора роста). Однако выявление генных мутаций зачастую осложняется рядом обстоятельств: 1) ограниченным количеством образца ДНК; 2) длительностью и стоимостью анализа, затратами труда и реактивов; 3) низким содержанием мутантных

аллелей в исследуемом образце ДНК [2]. Критически важной в этой ситуации является возможность надежного, быстрого и экономичного сканирования генных мутаций.

В наибольшей степени удовлетворяет этим требованиям метод плавления ДНК (DNA melting analysis, DMA) с использованием гидролизуемых зондов TaqMan. Он прост в исполнении, производителен, экономичен и, кроме того, реализуется в «закрытом формате», исключающем перекрестное загрязнение образцов [3–5]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что зонды TaqMan могут быть использованы не только для мониторинга полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ) и сканирования мутаций посредством DMA, но и в качестве блокирующих амплификацию

агентов. Это позволило проводить «обогащенную» ПЦР мутантных аллелей и примерно в 10 раз повысить чувствительность их обнаружения [6].

При этом асимметричный вариант ПЦР, который является необходимым условием данного подхода, так как обеспечивает избыточный синтез одной из 2 нитей ампликона, имеет ряд ограничений: 1) низкая эффективность амплификации и невозможность количественной оценки числа копий исследуемого гена; 2) необходимость проведения 2 независимых тестов для двунитевого сканирования мутаций, что увеличивает стоимость метода, затраты времени, труда и расходных материалов; 3) усложнение дизайна ПЦР.

Отмеченные ограничения этого весьма перспективного метода возможно устранить, используя комбинированные праймеры, которые состоят из универсальной и специфической последовательностей и способствуют образованию одностебельных ампликонов-«шпикел» (sense и antisense). Последние стерически не способны ренатурировать друг с другом, но с высокой эффективностью гибридизуются с зондами TaqMan (antisense и sense соответственно). Это позволяет достичь поставленной цели: посредством симметричной ПЦР-РВ с последующим DMA определять как количественные (число копий), так и качественные (присутствие мутаций в обеих нитях ампликона) показатели исследуемого гена.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Образцы опухолевой ткани (рака легкого и толстой кишки, меланомы) были получены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Образцы опухолевой ткани замораживали в жидком азоте или фиксировали формальдегидом и заключали в парафиновые блоки. ДНК выделяли из клеток и опухолевой ткани депротеинизацией фенолом и хлороформом, а из ткани в парафиновых блоках — с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию ДНК

определяли спектрофотометрически (Nano-Drop 1000, Thermo Scientific).

Секвенирование обеих нитей ампликона *KRAS* осуществляли методом Сэнгера с использованием панели BrightDye Terminator reagents (Nimagen, Нидерланды) и последующим анализом продуктов реакции на автоматическом анализаторе ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Syntol, Россия).

Термодинамические расчеты температуры плавления ДНК (T_m) выполняли с помощью программы MeltCalc [7].

Разделение ДНК методом SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) [8, 9] проводили посредством электрофореза в 12 % полиакриламидном геле (отношение акриламид/бисакриламид 1:50), приготовленном на 0,5-кратном трис-ацетатном буфере; pH 8,0; 2,5 ч при 400 В (20 В/см) и температуре +4 °С. Полосы окрашивали SYBR Gold (разведение 1:10 000).

ПЦР-РВ и DMA. Размеры ампликонов *KRAS*, а также праймеры и зонды TaqMan к ним представлены в таблице. Праймеры к последовательности *KRAS* (Genbank Accession number NG_007524.1) определили с помощью программы Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Corp., США). Схема ампликонов *KRAS* с взаимным расположением праймеров (стандартных и комбинированных), зондов TaqMan и «горячего» участка (кодона 12 и 13) представлена на рис. 1. Зонды «сдвинуты» друг относительно друга (перекрывание — 8 оснований) во избежание их «полной» гибридизации во время ПЦР-РВ и DMA. Ампликоны размером 114 и 174 пары оснований синтезируются при использовании стандартных и комбинированных праймеров соответственно (последние содержат на 5'-конце универсальную GC-обогащенную последовательность UPS (Universal Primer Sequence)) [10].

Симметричную ПЦР-РВ проводили в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Инкубационная смесь (25 мкл) содержала 67 мМ трис-HCl, pH 8,8; 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

Полимеразная цепная реакция и метод плавления ДНК

Праймер*, зонд TaqMan**	Ампликон*** (длина, пары оснований)	Последовательности праймеров и зондов (число оснований)
Стандартный праймер: прямой обратный	K2(114)	5'-gcctgctgaaatgactg (18) 5'-ttggatcatattcgtccacaa (21)
Комбинированный праймер: прямой обратный	K2(174)	5'-gcggcgctactagcgtaccgctagcgacggcgctgctgaaatgactg (48) 5'-gcggcgctactagcgtaccgctagcgacgggtggatcatattcgtccacaa (51)
Зонды TaqMan: K2-ROX(25)s K2-Cy5(25)as		5'-ROX-actgtgtgtgtgtgagctggtggc-BHQ2 5'-Cy5-aaggcactcttgcctacgccaccag-BHQ2

*Специфические (геномные) последовательности стандартных и комбинированных праймеров одинаковы и обозначены строчными буквами; универсальная последовательность комбинированных праймеров подчеркнута.

**В названии зонда TaqMan указаны ампликон, флуорофор, длина олигонуклеотида и направление (sense или antisense).

***Название ампликона произведено от названия гена, номера экзона и размера (пары оснований).

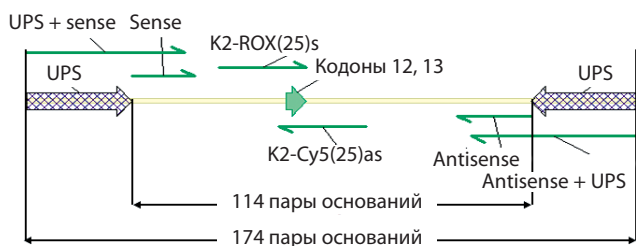


Рис. 1. Схема ампликонов K2(114) и K2(174) (название ампликона произведено от гена KRAS, номера экзона и размера ампликона). Стрелками показано расположение праймеров (стандартных и комбинированных, т. е. с последовательностью UPS), зондов TaqMan и «горячего» участка KRAS (кодоны 12 и 13)

0,01 % Tween 20; 2,5 мМ MgCl₂; по 0,2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов; по 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров; по 0,1 мкМ зондов TaqMan K2-ROX(25)s и K2-Cy5(25)as (см. таблицу); 1,5 ед. Hot-rescue Taq-полимеразы; 5 мкл раствора ДНК (30–100 нг) в воде. Условия ПЦР: начальная денатурация в течение 5 мин при температуре 95 °С, после чего 50 циклов плавления (15 с при температуре 95 °С), отжига (30 с при температуре 56 °С) и элонгации (30 с при температуре 72 °С) с регистрацией флуоресценции.

Условия DMA: денатурация в течение 3 мин при температуре 95 °С, быстрое охлаждение до 55 °С и инкубация 3 мин при 55 °С, после чего плавление до 85 °С с шагом 0,4 °С (выдержка 10 с). Данные анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX Manager (версия 1.6).

Результаты и обсуждение

Возможность тестировать мутации методом DMA с зондами TaqMan реализуется за счет отказа от количественного анализа ДНК, поскольку требует асимметричного (значительно менее эффективного) варианта амплификации. Так обеспечивается присутствие в инкубационной среде наряду с двунитевыми ампликонами некоторого числа избыточных одонитевых ампликонов (не находящихся себе комплементарной пары). В DMA они служат «мишенями» зондов TaqMan.

Поскольку в процессе асимметричной ПЦР можно создать избыток только одной (sense или antisense) нити, то для мутационного сканирования обеих нитей необходимо проведение 2 независимых тестов. Аналогично общепринятой практике двунитевого секвенирования ДНК исследование зондами TaqMan обеих нитей ампликона представляется целесообразным, поскольку оно, по нашим данным, повышает надежность и чувствительность анализа [4].

Отмеченные недостатки, равно как относительно низкая эффективность асимметричной ПЦР, стимулируют поиск «симметричного» варианта амплификации для последующего мутационного сканирования. Препятствием здесь оказывается быстрая и неизбежная ренатурация комплементарных ампликонов, присутствующих в среде в эквимольных концентрациях

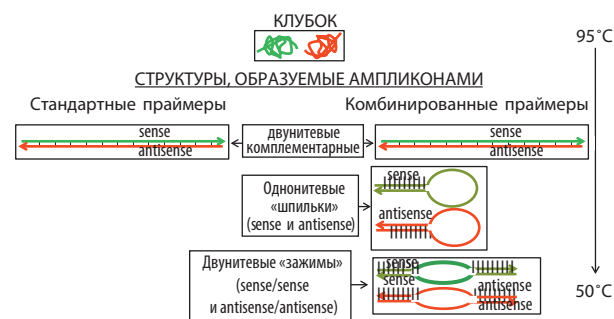


Рис. 2. Схема структур, возникающих при ренатурации стандартных и «шпильчатых» ампликонов

(для гибридизации зондов при этом не остается «свободных» матриц).

Практически реализуемым решением задачи сохранения части комплементарных ампликонов в одонитевой форме (и их способности взаимодействовать с зондами TaqMan, но не друг с другом) является придание им псевдокольцевой («шпильчатой») конформации. Она может возникнуть, когда на обеих сторонах олигонуклеотида имеются «липкие концы», для чего достаточно присутствия на 5'-стороне каждого праймера одной и той же (универсальной) последовательности [10]. На рис. 2 представлены вероятные структуры, возникающие при ренатурации обычных ампликонов и UPS-ампликонов (ампликонов, содержащих на 5'-конце последовательность UPS). Если в первом случае формируются исключительно линейные двунитевые «стержни», то во втором наряду со «стержнями» могут возникать одонитевые «шпильки» (sense и antisense), а также двунитевые «зажимы» (clamps), состоящие из 2 идентичных (sense/sense и antisense/antisense) антипараллельно идущих нитей. В отличие от линейных ампликонов «шпильки» и «зажимы» сохраняют геномные последовательности в одонитевой форме и, следовательно, должны быть доступны зондам TaqMan.

Прежде всего мы оценили возможность использования комбинированных праймеров в симметричной ПЦР-РВ. Серийные разведения ДНК, выделенной из нормальных клеток крови человека, использовали для синтеза ампликонов K2(114) и UPS-ампликонов K2(174); мониторинг реакции вели посредством зондов TaqMan K2-Cy5(25)as и K2-ROX(25)s соответственно. Эффективность амплификации в обоих случаях оказалась одинаково высокой — около 100 % (рис. 3).

Возможность формирования UPS-ампликонами различных конформаций показана в опытах сдвига полосы (band shift), в которых продукты ПЦР-РВ анализировали методом SSCP [8, 9]. Особенность такого электрофореза — быстрая миграция линейных двунитевых «стержней», опережающая таковую соразмерных одонитевых «клубков». В соответствии с этой особенностью структуры, содержащие одонитевые «шпильки», движутся медленнее линейного

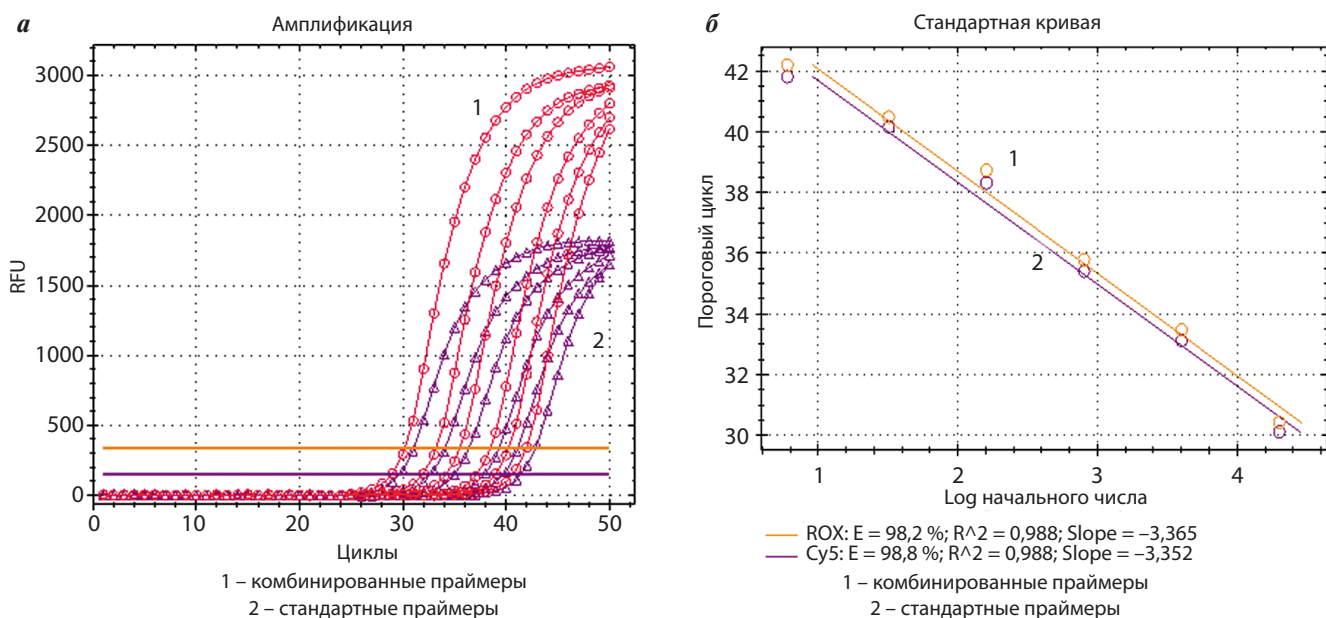


Рис. 3. Сопоставление эффективности симметричной полимеразной цепной реакции со стандартными или комбинированными праймерами: а – амплификация; б – стандартные серийные разведения (E – эффективность амплификации; R^2 – коэффициент корреляции; Slope – наклон линии, позволяющий определить эффективность амплификации)

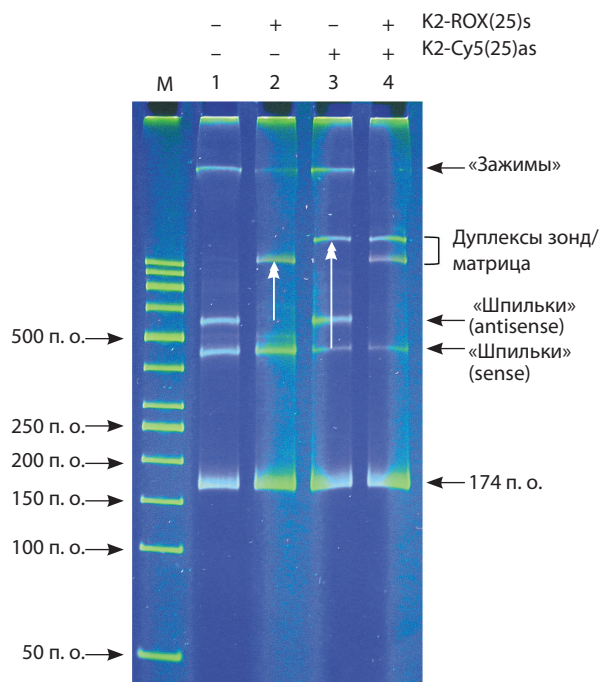


Рис. 4. Анализ продуктов симметричной полимеразной цепной реакции с комбинированными праймерами методом SSCP (M – маркеры молекулярной массы). Стрелками на фоне рисунка показаны сдвиги полос (band shifts), обусловленные взаимодействиями ампликонов с зондами TaqMan (обозначены над рисунком). Электрофоретические полосы, соответствующие различным комплексам, указаны стрелками (п. о. – пары оснований)

ампликона K2(174) (рис. 4). Отчетливые сдвиги полос (стрелки на фоне рис. 4), вызванные добавлением зондов K2-ROX(25)s и K2-Cy5(25)as, позволяют, во-первых, идентифицировать каждую из полос и,

во-вторых, сравнить связывающую способность зондов (если судить по полноте сдвига, наиболее эффективен в этом отношении K2-ROX(25)s). Не во всех экспериментах, но довольно часто видна медленно движущаяся, расположенная над «шпильками» полоса. Поскольку ее интенсивность при добавлении зондов заметно ослабевает (свидетельство взаимодействия и изменения подвижности), можно предположить, что она образована двунитевыми «зажимками» – единственными, помимо «шпилек», структурами, теоретически способными взаимодействовать с зондами.

На следующем этапе установлено, что количественные соотношения между разными конформациями варьируют в зависимости от условий ренатурации ампликонов. Очевидно, что термодинамически наиболее выгодны линейные «стержни», состоящие из 2 полностью комплементарных нитей (они являются итогом бимолекулярной реакции 2-го порядка). Менее термодинамически выгодные, частично комплементарные «шпильки» обладают, однако тем преимуществом, что возникают в результате внутримолекулярной реакции, т. е. формируются быстрее. Что касается частично комплементарных «зажимов», то они преимуществом «шпилек» не обладают, так как возникают в ходе бимолекулярной реакции (это, возможно, объясняет непостоянство их возникновения).

Поскольку оптимальные температуры ренатурации «стержней» и «шпилек» в реакционных условиях составляют примерно 85 и 75 °C соответственно [7], для увеличения доли «шпилечной» конформации отжиг ампликонов от 95 до 55 °C следует проводить так быстро, как только позволяет прибор

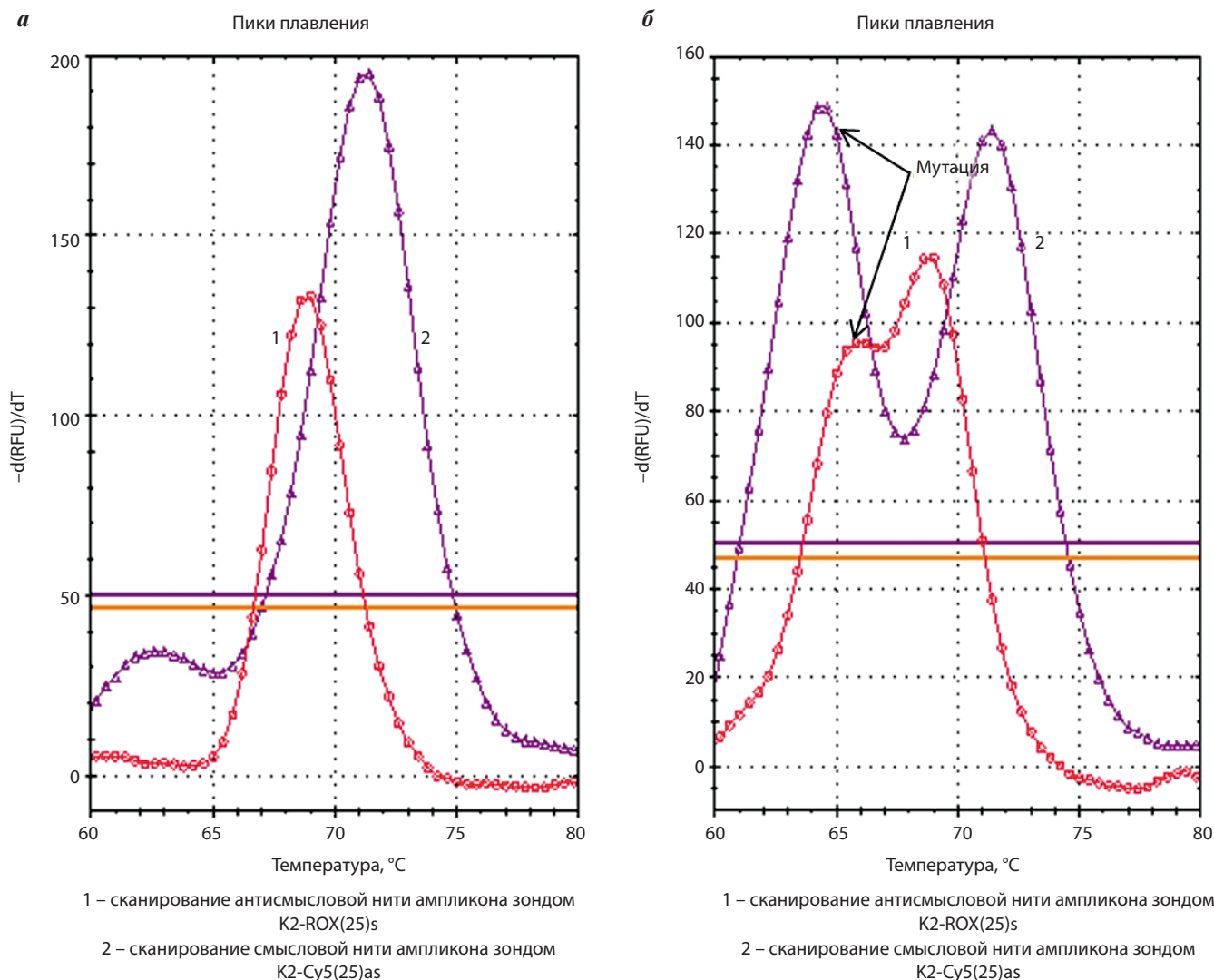


Рис. 5. Двунитевое сканирование онкогена *KRAS*: а – ДНК дикого типа (оба пика симметричны); б – ДНК рака толстой кишки с мутацией *GGC13GAC* (обе кривые обнаруживают присутствие гетеродуплексов, но в разной степени выраженное и с разной степенью дискриминации нормальных и мутантных аллелей). Стрелками указаны идентифицирующие мутацию гетеродуплексы

(так уменьшается время пребывания расплавленных ампликонов в интервале температур, оптимальном для формирования «стержней»). В проверочных экспериментах (здесь не представлено) подтверждено значительное усиление флуоресцентного сигнала зондов TaqMan при ускорении этапа ренатурации ампликонов.

Использование ампликонов-«шпилек» позволяет устранить ограничения стандартного DMA с зондами TaqMan, обусловленные необходимостью асимметричного варианта ПЦР. На рис. 5 представлены пики плавления ампликона гена *KRAS* из нормальной и опухолевой ткани (рак толстой кишки, мутация *GGC13GAC*). Оказалось возможным одновременно протестировать обе нити ампликона и в случае опухолевой ДНК идентифицировать мутацию в каждой из них (см. рис. 5б). Возможность исследовать обе нити ампликона важна, поскольку заранее неизвестно, какая из них более пригодна для выявления данного

типа мутации, т.е. эффективнее дискриминирует нормальный и мутантный аллели. Очевидно поэтому, что 2 теста дополняют друг друга.

На рис. 6 представлены результаты мутационного сканирования образцов ДНК, выделенных из парафиновых блоков ткани рака толстой кишки (мутации *GGT12GTT* и *GGT12GCT* гена *KRAS* соответственно), свидетельствующие о высокой эффективности двунитевого сканирования в клинической генодиагностике.

Заключение

Предлагаемый вариант симметричной ПЦР с последующим плавлением ДНК позволяет, с одной стороны, проводить количественную оценку числа копий анализируемых генов и, с другой, сканировать генные мутации в ДНК культивируемых клеток, тканей и парафиновых блоков. Метод прост и реализуется в «закрытом формате» (в одной пробирке

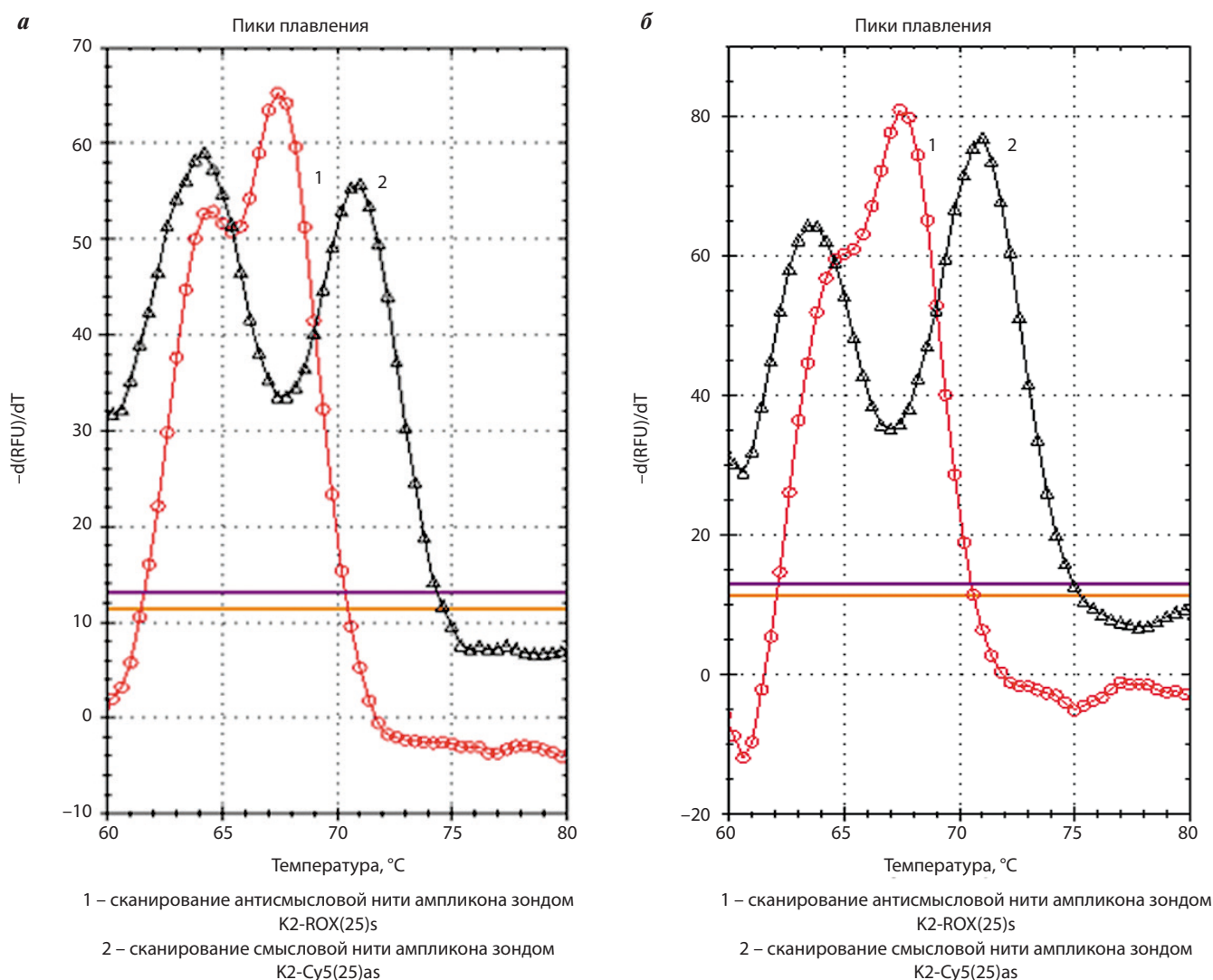


Рис. 6. Двунитевое мутационное сканирование онкогена *KRAS* в ДНК опухолевой ткани (рак толстой кишки), выделенной из парафиновых блоков: а – мутация GGT12GTT; б – мутация GGT12GCT (обозначения те же, что и на рис. 5)

без промежуточных или дополнительных процедур), минимизирующем риск перекрестного загрязнения клинических образцов. Одновременное двунитевое тестирование ампликона, повышающее надежность и чувствительность анализа, не требующее отказа от симметричного варианта ПЦР и, кроме того,

не сопряженное с дополнительными затратами времени и труда, может найти широкое применение в экспериментальном и клиническом генотипировании.

Подана заявка на изобретение № 2016128057 «Способ сканирования генных мутаций в опухолях человека» (приоритет от 12.07.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012;72(10): 2457–67.
2. Yang W., Shelton D.N., Berman J.R. et al. Droplet digital™ PCR: multiplex detection of KRAS mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded colorectal cancer samples. *Biotechniques* 2015;58:205–6.
3. Huang Q., Liu Z., Liao Y. et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes. *PLoS One* 2011;6(4):e19206.
4. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with TaqMan probes for detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations. *Anal Biochem* 2015;491: 75–83.
5. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Asymmetric real-time PCR and multiplex melting curve analysis with TaqMan probes for detecting PIK3CA mutations. *Data Brief* 2015;5: 913–7.
6. Botezatu I.V., Panchuk I.O., Stroganova A.M. et al. TaqMan probes as blocking agents for enriched PCR amplification and DNA melting analysis of mutant genes. *Biotechniques* 2017;62(2):62–8.
7. Schutz E., von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* 1999;27(6):1218–22.

8. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2766–70.
9. Yap E.P., McGee J.O. Nonisotopic discontinuous phase single strand conformation polymorphism (DP-SSCP): genetic profiling of D-loop of human mitochondrial (mt) DNA. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4155.
10. Guthrie P.A., Gaunt T.R., Abdollahi M.R. et al. Amplification ratio control system for copy number variation genotyping. *Nucleic Acids Res* 2011;39(8):e54.

Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена *MGMT* в глиомах

Д.В. Табаков¹, А.Н. Катаргин², А.М. Строганова¹, А.И. Сендерович¹, Д.Р. Насхлеташвили¹, Н.П. Киселева²

¹НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталия Петровна Киселева natalia-kis@yandex.ru

Глиомы — наиболее распространенные опухоли головного мозга, трудно поддающиеся ранней диагностике и лечению. Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) играют существенную роль в глиомогенезе, диагностике и выборе терапии пациентов. Было исследовано распределение мутаций *IDH1/2* в глиомах различных гистологических типов и степеней злокачественности методом анализа кривых плавления ДНК с зондами TaqMan по разработанному нами протоколу, позволяющему определять мутации с чувствительностью 5 %. Специфичность определения мутаций подтверждена секвенированием по Сэнгеру. В глиомах II и III степеней злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения частота мутаций *IDH1/2* составила 74 %, в глиобластомах (IV степень злокачественности) — 14 %. Глиомы, содержащие клетки с олигодендроцитарным типом дифференцировки, достоверно чаще имели мутации *IDH1/2*, чем другие типы глиом ($p = 0,014$). Преобладающим типом мутаций являются мутации *IDH1* (79 % от общего числа мутаций). Одно из последствий мутаций *IDH1/2* — индукция aberrantного метилирования генов. Анализ метилирования промотора гена *O6*-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*, *O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*), предсказательного маркера чувствительности глиом к терапии алкилирующими агентами у тех же больных, показал частичную ассоциацию с мутациями *IDH1/2*. В 73 % случаев с мутациями *IDH1/2* наблюдалось метилирование *MGMT*. В то же время в 67 % случаев с метилированием *MGMT* отсутствовали мутации *IDH1/2*, что указывает на существование других механизмов метилирования *MGMT* в глиомах. Данные свидетельствуют в пользу необходимости одновременного определения 2 биомаркеров при выборе послеоперационной терапии пациентов.

Ключевые слова: глиома, мутации *IDH1* и *IDH2*, метилирование *MGMT*, плавление ДНК

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59

Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes mutations and *MGMT* methylation in gliomas

D.V. Tabakov¹, A.N. Katargin², A.M. Stroganova¹, A.I. Senderovich¹, D.R. Naskhletashvili¹, N.P. Kiseljova²

¹Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Gliomas are the most common brain tumors. It is difficult to detect them at early stages of disease and there is a few available therapies providing significant improvement in survival. Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes (*IDH1* and *IDH2*) play significant role in gliomogenesis, diagnostics and selection of patient therapy. We tested the distribution of *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas of different histological types and grades of malignancy by DNA melting analysis using our protocol with a sensitivity of 5 %. The results of this assay were confirmed by conventional Sanger sequencing. *IDH1/2* mutations were detected in 74 % of lower grade gliomas (II and III, World Health Organization) and in 14 % of glioblastomas (IV, World Health Organization). Mutation rate in gliomas with oligodendroglioma component were significantly higher than in other glioma types ($p = 0.014$). The *IDH1* mutations was the most common (79 % of general mutation number). *IDH1/2* mutations can induce aberrant gene methylation. Detection of methylation rate of the gene encoding for *O6*-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*), predictive biomarker for treatment of gliomas with the alkylating agents, has demonstrated a partial association with *IDH1/2* mutations. In 73 % of *IDH1/2*-mutant tumors *MGMT* promoter methylation were observed. At the same time *IDH1/2* mutations were not revealed in 67 % tumors with *MGMT* promoter methylation. These results indicate existence of another mechanism of *MGMT* methylation in gliomas. Our data strong support for necessity of both markers testing when patient therapy is selected.

Key words: glioma, *IDH1* and *IDH2* mutations, *MGMT* methylation, DNA melting

Введение

Глиомы — наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга, включающие опухоли различных гистологических типов и степеней

злокачественности, трудно поддающиеся ранней диагностике и лечению.

Классификация глиом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), основанная на гистологи-

ческом сходстве опухолевых клеток с различными типами нормальных клеток глии и морфологии опухоли, различает 4 степени злокачественности (I–IV) [1]. Разработка и введение в клиническую практику молекулярных маркеров в дополнение к классификации ВОЗ позволяют выделять подтипы глиом, которые существенно различаются по выживаемости и чувствительности к терапии [2, 3].

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) играют существенную роль в глиомогенезе, а также определяют диагностику и выбор терапии пациентов [4, 5]. Функция изоцитратдегидрогеназ заключается в окислительном декарбоксилировании изоцитрата, который превращается в α -кетоглутарат. Соматические мутации в генах *IDH1* и *IDH2*, обнаруживаемые в глиомах и некоторых других опухолях, представляют собой гетерозиготные миссенс-мутации в каталитическом домене ферментов. Наиболее распространенные (> 90 % случаев) мутации вызывают замену аргинина (R132) на гистидин в *IDH1* и аргинина (R172) на лизин в *IDH2*. В остальных случаях более редкие мутации в этом же кодоне вызывают замену аргинина на другие аминокислоты [5]. Мутации приводят к потере нормальной функциональной активности ферментов (образование α -кетоглутарата) и приобретению новой функции (образование 2-гидроксиглутарата). Таким образом, мутации в генах *IDH1* и *IDH2* имеют по крайней мере 2 последствия для клетки. Во-первых, снижается уровень нормального метаболита α -кетоглутарата, который является ключевым промежуточным продуктом цикла Кребса, необходимым для нормального его прохождения и для многих других процессов в клетке, таких как метаболизм жиров, ацетилирование белков и др. Роль нарушения этих процессов в канцерогенезе пока мало изучена. Во-вторых, в клетках глиом накапливается 2-гидроксиглутарат, который рассматривается как онкометаболит [6]. Показано, что 2-гидроксиглутарат — ингибитор α -кетоглутаратзависимых ферментов диоксигеназ, к которым относятся гистоновые H3K9/H3K36-деметилазы семейства KDM4 и ферменты семейства TET, участвующие в деметилировании ДНК [7]. Предположение о том, что мутации *IDH1/2* могут изменять паттерны метилирования ДНК и гистонов в опухолевых клетках в связи с ингибированием соответствующих ферментов, было подтверждено экспериментами в культуре клеток [8–10]. В то же время в клинических исследованиях была охарактеризована группа глиом, обладающих специфическим фенотипом (CIMP, CpG-island methylator phenotype), отличающимся координированным гиперметилированием ДНК в промоторах многих генов-супрессоров. В этих глиомах CIMP статистически достоверно был ассоциирован с соматическими мутациями *IDH1* [11].

Кроме этого, в экспериментах с культурами клеток было продемонстрировано, что клетки, содержащие мутантные *IDH1/2*, обладают повышенными

радиочувствительностью и чувствительностью к химиопрепаратам, что, по-видимому, связано с нарушением ответа на окислительный стресс [12–14]. Увеличение чувствительности глиом с мутантными *IDH1/2* к радио- и химиотерапии также было показано и в клинических исследованиях [15, 16]. Все вышесказанное говорит о необходимости систематического определения мутационного статуса *IDH1/2* в клинической практике.

В связи с тем, что мутации *IDH1/2* нарушают метилирование ДНК в опухолевых клетках, были сделаны попытки определить наличие корреляции метилирования промотора гена O6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase) с наличием мутаций *IDH1/2*. Метилирование *MGMT* рассматривается в настоящее время как предсказательный маркер, указывающий на чувствительность глиом к химиотерапии алкилирующими агентами [17].

Являясь одним из ферментов системы репарации ДНК, *MGMT* удаляет метильные и хлорэтильные группы из O6-позиции гуанина, нейтрализуя цитотоксический эффект алкилирующих агентов [18]. В нормальных клетках глии ген *MGMT* экспрессируется на высоком уровне. Снижение уровня экспрессии фермента за счет метилирования промотора гена, наблюдающегося только в опухолевых клетках, увеличивает цитотоксичность алкилирующих агентов избирательно по отношению к опухолевым клеткам. Хотя важность определения мутаций *IDH1/2* и метилирования *MGMT* общепризнанна, остается неясным, они предоставляют перекрывающуюся или независимую информацию как биомаркеры [19, 20].

В данной работе мы исследовали распределение мутаций *IDH1/2* в глиомах различных гистологических типов и степеней злокачественности методом анализа кривых плавления ДНК, выделенной из рутинных парафиновых срезов удаленных опухолевых тканей, фиксированных формальдегидом [21].

Разработанный нами протокол обеспечивал чувствительность 5 % и показал 100 % корреляцию с результатами определения мутаций с помощью «золотого стандарта» — секвенирования по Сэнгеру, чувствительность которого составляет 10–20 %. Показана лишь частичная ассоциация мутаций *IDH1/2* и метилирования промотора гена *MGMT* в глиомах, что свидетельствует в пользу определения 2 биомаркеров для каждого пациента при выборе послеоперационной терапии.

Материалы и методы

Клинические материалы. Были использованы фиксированные формальдегидом, заключенные в парафиновые блоки ткани глиом, удаленные у пациентов, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клинический диагноз был подтвержден двойным гистологическим исследованием всех образцов в отделении патологической анатомии опухолей человека. Выборка из 210 глиом включала образцы II–IV

степеней злокачественности согласно классификации ВОЗ (табл. 1).

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из тканей опухолей, заключенных в парафиновые блоки, использовали срезы толщиной 25 мкм. После механического выделения опухолевого материала из среза при микроскопическом контроле и депарафинизации его ксилолом (1 мин) ДНК выделяли с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Германия) по протоколу фирмы.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и определение профиля плавления продукта ПЦР. Использовали зонды типа TaqMan с флуорофором ROX на 5'-конце и гасителем BHQ2 на 3'-конце олигонуклеотида. Олигонуклеотиды были комплементарны к смысловой цепи ДНК, не содержащей мутаций. Весь анализ выполняли в одной пробирке, что снижало вероятность перекрестных загрязнений образцов. Состав праймеров и зондов: *IDH1* F-TCT TCA GAG AAG CCA TTA TC, R-CAC ATT ATT GCC AAC ATG A, зонд 5' (ROX) CATAAGCATGACGACCTATGATGAT (BHQ2) 3' (продукт ПЦР 118 пар нуклеотидов (п. н.)); *IDH2* F-AAA CAT CCC ACG CCT AGT CC, R-AAA GTC TGT GGC CTT GTA CTG C, зонд 5' (ROX) CATGGGCGTGCCCTGCCAATGGTGA (BHQ2) 3' (продукт ПЦР 171 п. н.). Кодоны, соответствующие аргининам 132 в *IDH1* и 172 в *IDH2*, в которых наблюдаются мутации в опухолях, подчеркнуты. Реакционная смесь имела следующий состав: 10-кратный реакционный буфер для ПЦР — 2,5 мкл; ДНК-полимераза Hot Start Taq (Евроген, Россия) — 1,2–2,5 ед. активности на реакцию; $MgCl_2$ — 2,5 ммоль; дезоксинуклеотидтрифосфаты — до 200 мкмоль; прямой праймер — 12 пкмоль; обратный праймер — 1,2 пкмоль (для обеспечения преимущественной амплификации смысловой цепи в асимметричной ПЦР); зонд TaqMan (Синтол, Россия) — 5 пкмоль; вода — до общего объема 25 мкл; не менее 40 нг ДНК-матрицы. Реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) для обеих пар праймеров следующим образом: 95 °C — 3 мин, (95 °C — 13 с, 54 °C — 40 с, 72 °C — 20 с) × 40 циклов; затем плавление продукта ПЦР: при температуре 95 °C 1 мин, при 54 °C 8 мин, от 54 до 90 °C повышение температуры на 0,3 °C при каждом шаге с продолжительностью шага 12 с. В качестве матрицы для положительного контроля использовали клонированный в плазмидном векторе pTZ57R/T (Fermentas, Литва) продукт ПЦР *IDH1* и *IDH2* дикого и мутантного типов соответственно.

Определение чувствительности метода выявления мутаций *IDH* плавлением продукта ПЦР. Чувствительность метода определяли анализом кривых плавления продуктов в 3 независимых ПЦР, в которых в качестве матрицы использовали смесь клонированных аллелей дикого и мутантного типов *IDH* в разных соотношениях. За порог чувствительности принимали минимальную

концентрацию мутантного аллеля в смеси с аллелем дикого типа в процентах, при которой еще выявлялся двухфазный характер кривой.

Определение нуклеотидной последовательности продукта ПЦР. После проведения симметричной ПЦР продукт реакции разделяли в 2 % агарозном геле, выделяли из геля замораживанием/оттаиванием и определяли нуклеотидную последовательность ампликона, используя указанные выше праймеры, в Центре коллективного пользования «Геном» НИИ молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта по протоколу Центра.

Метил-специфичная ПЦР для гена *MGMT*. Реакцию проводили как описано ранее [22]. Использовали 2 набора праймеров к верхней цепи ДНК, конвертированной в результате обработки бисульфитом натрия с помощью готового набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США): 1) для метилированной последовательности сенс — 5' TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC (1063 п. н.), антисенс №1 — 5' GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G (1122 п. н.), антисенс №2 — 5' ACC ACT CGA AAC TAC CAC CGT CC (1158 п. н.); 2) для неметилированной последовательности сенс — 5' GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT (1059 п. н.), антисенс №1 — 5' AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A (1127 п. н.), антисенс №2 — 5' ACC ACT CAA AAC TAC CAC CAT CC (1158 п. н.). Позиции праймеров указаны по сиквенсу гена *MGMT* NC_000010.11 (GenBank), начиная от –1000 п. н. от старта транскрипции. ПЦР проводили по следующей программе: 95 °C — 5 мин, (95 °C — 30 с, 60 °C для праймеров к метилированной последовательности и 64 °C для праймеров к неметилированной последовательности — 30 с, 72 °C — 40 с) × 40 циклов, 72 °C — 10 мин. Фрагменты ДНК, полученные в процессе ПЦР, разделяли в 4 % агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл).

Результаты

Определение мутаций *IDH1/2* флуоресцентным анализом кривых плавления продуктов ПЦР. Первоначально ДНК из 24 образцов глиобластом анализировали одновременно секвенированием по Сэнгеру и ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-меченными зондами с последующим анализом кривых плавления продуктов ПЦР. На рис. 1 представлены примеры кривых плавления продуктов ПЦР и подтверждения мутационного статуса *IDH1/2* секвенированием. Гетеродуплекс, образующийся между мутантным аллелем и зондом, не имеющим мутации, имеет более низкую температуру плавления, чем гомодуплекс зонда с аллелем дикого типа. Однофазная кривая плавления указывает на присутствие аллелей только дикого типа, двухфазная кривая с дополнительным пиком со сниженной температурой плавления — на смесь молекул мутантного и дикого типов.

При разработке протокола учитывали влияние на температуру плавления гетеро- и гомодуплексов, сочетания флуорофора и гасителя, длины зондов,

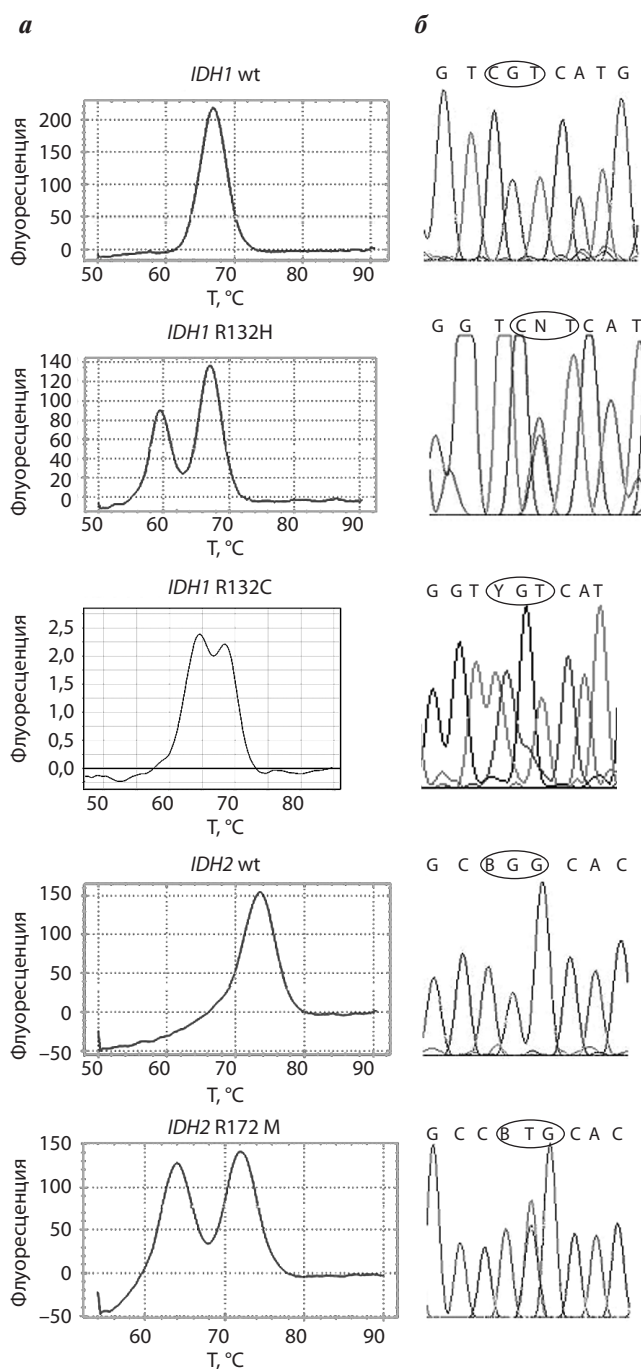


Рис. 1. Определение гетерозиготных мутаций IDH1 и IDH2 в образцах глиом 2 методами: а — кривые плавления продуктов полимеразных цепных реакций (ПЦР), проведенных с праймерами к участкам генов IDH1 и IDH2, включающих кодоны для аргинина 132 (R132) и 172 (R172) соответственно; анализ основан на разнице температур плавления дуплексов, образующихся между зондом и аллелями дикого (wt) или мутантного типов; б — определение нуклеотидной последовательности секвенированием по Сэнгеру продукта ПЦР; овалом отмечены кодоны, соответствующие R132 и R172

использования сенс- или антисенс-цепи ДНК в качестве мишени для зонда и некоторых других условий [23].

В нашей выборке во всех случаях на двухфазных кривых сдвиг температур плавления для мутантных аллелей по сравнению с диким типом составлял 4–8 °С, что значительно превышает соответствующий сдвиг

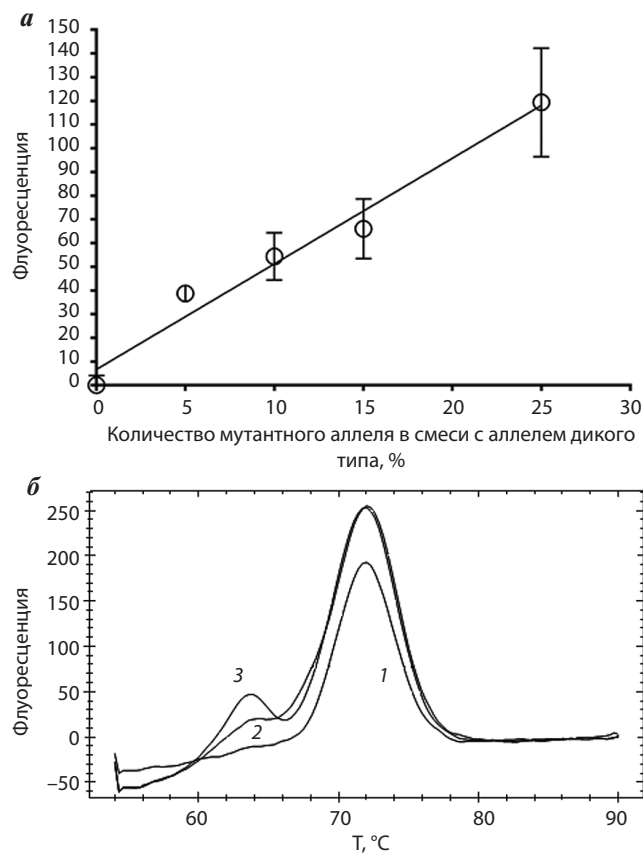


Рис. 2. Чувствительность метода анализа мутаций: а — результаты анализа кривых плавления продуктов 3 независимых полимеразных цепных реакций (вертикальные скобки — стандартное отклонение; в качестве матрицы в реакциях использовали смесь клонированных аллелей дикого и мутантного типов в разных соотношениях); б — результаты типичного опыта для IDH2

при использовании интеркалирующих флуоресцентных красителей для анализа кривых плавления (не более 1 °С) [24]. Широкий интервал между температурами плавления мутантного и дикого вариантов позволяет не опасаться получения ложных результатов за счет различий температур плавления продуктов ПЦР с разными вариантами замен оснований в анализируемом кодоне на несколько градусов (см. рис. 1, сравни IDH1 R132H и R132C). Таким образом, с помощью одних и тех же праймеров и зонда предложенный протокол позволяет выявлять различные варианты точечных мутаций в анализируемом кодоне, описанные в литературе [5].

Результаты определения мутационного статуса 2 методами полностью совпали, что говорит о специфичности разработанного протокола.

Определение чувствительности метода анализа кривых плавления в нашей модификации показало, что минимальная концентрация мутантного аллеля в смеси с аллелем дикого типа, при которой еще выявляется двухфазный характер кривой плавления, составляет 5 % (рис. 2).

Таблица 1. Частота мутаций генов *IDH1* и *IDH2* в глиомах

Гистотип	Степень злокачественности*	Мутация гена <i>IDH1</i>	Мутация гена <i>IDH2</i>
Астроцитома	II	3/6	1/6
Олигодендроглиома	II	4/5	0/5
Олигоастроцитома	II	7/9	2/9
Анапластическая астроцитома	III	9/18	1/18
Анапластическая олигодендроглиома	III	8/12	2/12
Анапластическая олигоастроцитома	III	5/7	0/7
Всего		36/57 (63)	6/57 (11)
Глиобластома	IV	14/153 (9)	8/153 (5)

Примечание. Здесь и в табл. 2: цифры в скобках — частота события в процентах.

*Степень злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения [1].

Частота мутаций *IDH1/2* в глиомах. Используя описанный протокол, мы провели анализ мутаций *IDH1/2* в 210 образцах глиом различных степеней злокачественности и гистологических типов (см. табл. 1). В глиомах II и III степеней злокачественности частота мутаций *IDH1/2* составила 74 %. Глиомы, содержащие клетки с олигодендроцитарным типом дифференцировки, достоверно чаще (28 из 33) имели мутации *IDH1/2*, чем астроцитомы разных степеней злокачественности (14 из 24; $p = 0,014$). Таким образом, мутации выявляются уже в глиомах низких степеней злокачественности. В табл. 1 представлена суммарная частота мутаций в первичных и вторичных глиобластомах (IV степень злокачественности), которая составила 14 %. Подавляющее большинство образцов IV степени злокачественности в нашей выборке составляли вновь диагностированные глиобластомы без возможности их разделения по клинической истории на первичные и вторичные глиобластомы (предшественники последних — глиомы II и III степеней злокачественности). Низкая частота мутаций (14 %) в глиобластомах по сравнению с глиомами более низких степеней злокачественности указывает на преобладание в нашей выборке первичных глиобластом, для которых эти

мутации являются редкими [25, 26]. Преобладающим (79 %) типом мутаций во всех глиомах были мутации *IDH1*, при этом большинство из них были мутациями *IDH1R132H*. Только в 3 из 50 глиом, имеющих мутации *IDH1*, были обнаружены другие варианты замен оснований в том же кодоне. Мутации *IDH2* составляли 21 % от всех выявленных мутаций и были представлены наиболее распространенным типом мутаций R172K во всех случаях, кроме одного с мутацией R172M (см. рис. 1). Одновременного присутствия мутаций *IDH1* и *IDH2* не обнаружено ни в одном случае.

Мутации *IDH1/2* и метилирование промотора гена *MGMT* в глиомах. Метилирование *MGMT* было выявлено в 126 (60 %) из 210 глиом (табл. 2). При этом мы не наблюдали преобладания этого маркера в каком-либо из подтипов глиом (данные не представлены). Мутации *IDH1/2* присутствовали лишь в 42 (33 %) из 126 опухолей, в которых наблюдалось метилирование *MGMT*. С другой стороны, мутации *IDH1/2* не всегда сопровождалось метилированием гена *MGMT*. В 17 (27 %) из 64 глиом, имеющих мутации, не выявлено метилирования *MGMT*. Таким образом, наблюдалась лишь частичная ассоциация 2 биомаркеров.

Таблица 2. Соотношение мутаций *IDH1/2* и метилирования *MGMT* в глиомах

Степень злокачественности*	Частота <i>meMGMT</i>	<i>meMGMT</i>		<i>mutIDH1/2</i>	
		<i>mutIDH1/2</i>	<i>wtIDH1/2</i>	<i>meMGMT</i>	<i>unMGMT</i>
II + III	41/57	28/41	13/41	32/42	10/42
IV	85/153	14/85	71/85	15/22	7/22
Всего	126/210 (60)	42/126 (33)	84/126 (67)	47/64 (73)	17/64 (27)

Примечание. *meMGMT* — ген *MGMT* метилирован; *unMGMT* — ген *MGMT* не метилирован; *mutIDH1/2* — гены *IDH1/2* мутированы; *wtIDH1/2* — дикий тип генов.

Обсуждение

Обнаружение мутаций анализом кривых плавления ДНК с использованием зондов типа TaqMan является нетрудоемким, быстрым и относительно недорогим методом, снижающим возможность перекрестных контаминаций образцов [21, 23]. Лежащая в основе метода ПЦР позволяет использовать фрагментированную ДНК, выделенную из рутинных парафиновых срезов опухолевых тканей, фиксированных формальдегидом. Сравнение полученных результатов с «золотым стандартом» выявления мутаций прямым определением последовательности нуклеотидов по Сэнгеру показало 100 % корреляцию в выборке из 24 образцов, что говорит о специфичности разработанного протокола. Использование этого протокола позволяет обнаружить мутации, если они присутствуют всего в 5 % молекул ДНК в образце. Таким образом, чувствительность метода в данной модификации составила 5 %, что сравнимо с чувствительностью определения мутаций *IDH* методом пиросеквенирования (5 %), требующего дорогостоящего оборудования, и существенно превышает чувствительность секвенирования по Сэнгеру (10–20 %) [27].

Высокая частота мутаций *IDH1/2* уже при II степени злокачественности (17 (85 %) из 20 глиом) указывает на раннее появление этих мутаций и их вклад в глиомогенез. Глиомы, содержащие клетки с олигодендроглиальным типом дифференцировки, достоверно чаще имели мутации *IDH1/2*, чем астроцитомы разных степеней злокачественности ($p = 0,014$), как это наблюдалось и в других исследованиях. В целом результаты, полученные предложенным методом, хорошо согласуются с данными, опубликованными для других популяций [20, 25, 28]. Это говорит о корректности использованного протокола, с одной стороны, и об отсутствии специфических особенностей частоты мутирования и распределения мутаций *IDH1/2* между типами глиом в российской популяции пациентов, с другой. Насколько нам известно, это 1-е исследование распространенности мутаций *IDH1/2* в глиомах в России.

Метилирование промотора *MGMT* выявлено нами в 60 % глиом, что согласуется с частотой метилирования в других популяциях [17]. При этом присутствие мутаций *IDH1/2* лишь в 33 % глиом, имеющих метилирование *MGMT*, указывает на существование других механизмов метилирования *MGMT* в глиомах помимо снижения активности α -кетоглутаратзависимых ферментов. С другой стороны, мутации *IDH1/2* не сопровождались метилированием гена *MGMT* в 27 % глиом, имеющих мутации. Это говорит о необходимости каких-то дополнительных условий для метилирования гена, помимо изменения активности *IDH1/2*. Обнаруженная частичная ассоциация между метилированием *MGMT* и мутациями *IDH1/2* указывает на необходимость анализа статуса обоих маркеров для ведения больных после удаления глиом. Определение 2 маркеров тем более важно, поскольку каждый из них имеет независимую ассоциацию с повышенной выживаемостью пациентов, подвергающихся радиотерапии в сочетании с алкилирующими агентами, и, по-видимому, различным образом влияет на клинический ответ на терапию [29, 30].

Заключение

Разработан протокол метода плавления ДНК для анализа мутаций генов *IDH1/2* в глиомах, позволяющий определять мутации с чувствительностью 5 %. Специфичность определения мутаций подтверждена секвенированием по Сэнгеру в 24 образцах. В результате анализа более 200 глиом показаны раннее появление мутаций в процессе прогрессии глиом, преобладание мутаций *IDH1*, более высокая частота мутаций *IDH1/2* в глиомах олигодендроглиального происхождения по сравнению с другими гистотипами глиом. Одновременное определение мутаций *IDH1/2* и метилирования промотора *MGMT*, предсказательного маркера чувствительности глиом к химиотерапии алкилирующими агентами, выявило лишь частичную ассоциацию 2 биомаркеров. Данные свидетельствуют о пользе необходимости определения обоих биомаркеров для каждого пациента при выборе послеоперационной терапии.

Авторы выражают благодарность А. В. Лихтенштейну за консультации в процессе выполнения работы. Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (грант № 15-15-00125).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2): 97–109.
2. Vigneswaran K., Neill S., Hadjipanayis C.G. Beyond the world health organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med* 2015;3(7):95.
3. Борисов К.Е., Сакаева Д.Д. Генные нарушения и молекулярно-генетические подтипы злокачественных глиом. *Архив патологии* 2013;(3):52–61. [Borisov K.E., Sakaeva D.D. Gene disorders and molecular genetic subtypes of malignant gliomas. *Архив патологии* = *Pathology Archive* 2013;(3):52–61. (In Russ.)].
4. Parsons D.W., Jones S., Zhang X. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321(5897):1807–12.
5. Yan H., Ye D., Guan K.L., Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5562–71.
6. Losman J.A., Looper R., Koivunen P. et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 2013;339(6127):1621–5.

7. Xu W., Yang H., Liu Y. et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19(1):17–30.
8. Turcan S., Rohle D., Goenka A. et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012;483(7390):479–83.
9. Lu C., Ward P.S., Kapoor G.S. et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012;483(7390):474–8.
10. Duncan C.G., Barwick B.G., Jin G. et al. A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Res* 2012;22(12):2339–55.
11. Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K. et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510–22.
12. Shi J., Sun B., Shi W. et al. Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. *Tumour Biol* 2015;36(2):655–62.
13. Molenaar R.J., Botman D., Smits M.A. et al. Radioprotection of IDH1-mutated cancer cells by the IDH1-mutant inhibitor AGI-5198. *Cancer Res* 2015;75(22):4790–802.
14. Li S., Chou A.P., Chen W. Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation. *Neuro Oncol* 2013;15(1):57–68.
15. Okita Y., Narita Y., Miyakita Y. et al. IDH1/2 mutation is a prognostic marker for survival and predicts response to chemotherapy for grade II gliomas concomitantly treated with radiation therapy. *Int J Oncol* 2012;41(4):1325–36.
16. Tran A.N., Lai A., Li S. et al. Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry. *Neuro Oncol* 2014;16(3):414–20.
17. Weller M., Stupp R., Reifenberger G. et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010;6(1):39–51.
18. Christmann M., Verbeek B., Roos W.P. et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816:179–90.
19. Mukasa A., Takayanagi S., Saito K. et al. Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. *Cancer Sci* 2012;103(3):587–92.
20. Siegal T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J Clin Neurosci* 2015;22(3):437–44.
21. Lyon E., Wittwer C.T. Light cycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009;11(2):93–101.
22. Табаков Д.В., Строганова А.М., Сендерович А.И. и др. Анализ метилирования гена MGMT в глиомах методом модифицированной метил-специфичной ПЦР. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2015;(26):9–33. [Tabakov D.V., Stroganova A.M., Senderovich A.I. et al. Analysis of MGMT gene methylation in gliomas using modified methylation-specific PCR. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina* = *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2015;(26):9–33. (In Russ.)].
23. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with TaqMan probes for detection of KRAS, NRAS, and BRAF mutations. *Anal Biochem* 2015;491:75–83.
24. Berenstein R., Blau I.W., Kar A. et al. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;33:44.
25. Ichimura K., Pearson D.M., Kocialkowski S. et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009;11(4):341–7.
26. Измайлов Т.Р., Снигирева Г.П., Шишкина Л.В. и др. Генетические нарушения при первичных глиобластомах головного мозга. Вопросы онкологии 2016;62(4):471–8. [Izmaylov T.R., Snigireva G.P., Shishkina L.V. et al. Genetic disorders in primary brain glioblastomas. *Voprosy onkologii* = *Problems in Oncology* 2016;62(4):471–8. (In Russ.)].
27. Arita H., Narit Y., Matsushita Y. et al. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2015;32(1):22–30.
28. Hartmann C., Hentschel B., Simon M. et al. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res* 2013;19(18):5146–57.
29. Molenaar R.J., Verbaan D., Lamba S. et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol* 2014;16(9):1263–73.
30. Yang P., Zhang W., Wang Y. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 2015;6(38):40896–906.

Действие акадезина на клетки рака молочной железы в условиях гипоксии

А.М. Щербаков¹, Н.Э. Вавилов¹, О.Е. Андреева¹, **Б.В. Тяглов²**, А.С. Миронов²,
Р.С. Шакулов², К.В. Лобанов², С.В. Яроцкий², А.А. Штиль¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»;
Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

Контакты: Александр Михайлович Щербаков alex.scherbakov@gmail.com

Производное рибозида акадезин (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) проходит клинические испытания как перспективный противоопухолевый препарат. Внутриклеточная мишень акадезина аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (АМРК, adenosine monophosphate-activated protein kinase) — важный регулятор энергетического метаболизма. Правомерно предположить, что акадезин окажется активен в условиях гипоксии опухолей. В нормоксии (инкубация клеток в атмосфере с 21 % кислорода) акадезин вызывал торможение пролиферации и гибель клеток аденокарциномы молочной железы, в том числе линии трижды негативного рака. При снижении парциального давления кислорода до 1 % (экспериментальная гипоксия) акадезин ингибировал активацию промотор-репортерной конструкции, обусловленную транскрипционным фактором HIF-1α (hypoxia inducible factor 1 alpha). Этот эффект наблюдали при действии акадезина в концентрациях, сопоставимых с цитотоксическими. Акадезин сохранял цитотоксичность в условиях гипоксии и снижал обусловленную гипоксией устойчивость клеток линии MDA-MB-231 к действию цисплатина. Эти результаты расширяют область применения акадезина и позволяют предположить его эффективность в комбинированных режимах лекарственной терапии рака молочной железы, в том числе для опухолей с низкой оксигенацией.

Ключевые слова: акадезин, рак молочной железы, линия клеток MCF-7, гипоксия, транскрипционные факторы

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-60-64

Effect of acadesine on breast cancer cells under hypoxia

A.M. Shcherbakov¹, N.E. Vavilov¹, O.E. Andreeva¹, **B.V. Tyaglov²**, A.S. Mironov²,
R.S. Shakulov², K.V. Lobanov², S.V. Yarotskiy², A.A. Shtil¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms; 1 1st Dorozhnyy Proezd, Moscow 117545, Russia

The riboside derivative acadesine (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside) is currently being tested in clinical trials as a promising anti-tumor drug. Intracellular target of acadesine is adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), an important regulatory molecule of energy metabolism. It is expected that acadesine would be active in tumors under hypoxia conditions. In normoxia (cells incubated in 21 % oxygen), acadesine inhibited proliferation and induced cell death of breast adenocarcinoma, including the triple negative breast cancer line. When oxygen partial pressure was decreased to 1 % (experimental hypoxia), acadesine inhibited activation of reporter construct responsive to HIF-1α (hypoxia inducible factor 1 alpha) transcription factor. This effect was observed for acadesine in concentrations close to cytotoxic. Acadesine retained cytotoxicity under hypoxia and decreased the survival of the MDA-MB-231 cell line when used in combination with cisplatin. These results considerably widen acadesine's field of application and allow to assume its efficacy in chemotherapy combination regimens for breast cancer, including the tumors with low oxygenation.

Key words: acadesine, breast cancer, MCF-7 cell line, hypoxia, transcription factors

Введение

Злокачественные новообразования молочной железы занимают лидирующее место среди онкологических заболеваний у женщин. Статистика, представленная Global Burden of Disease Cancer Collaboration, свидетельствует, что ежегодно регистрируется более 1,8 млн случаев впервые выявленного рака молочной железы (РМЖ) и отмечено более 13 млн случаев инвалидности и нетрудоспособности [1]. Ежегодно умирают более

460 тыс. больных [1]. Ограниченная эффективность гормоно- и химиотерапии и развитие лекарственной устойчивости остаются причинами столь неблагоприятного течения заболевания. Способность противоопухолевых препаратов снижать уровень пролиферации и вызывать гибель опухолевых клеток лимитируется и физиологическими условиями в опухоли, главным образом снижением парциального давления кислорода (гипоксия).

Поиск новых возможностей индукции гибели опухолевых клеток при минимальном повреждении неопухолевых проводится в химических классах так называемых метаболических регуляторов. В последние годы исследованы противоопухолевые эффекты бигуанидов (высокоспецифичные агонисты аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) и регуляторы митохондриального метаболизма), дихлорацетата (модулятор митохондриального метаболизма), FK866 (регулятор обмена никотинамидадениндинуклеотида), аргининдеиминазы (регулятор биодоступности аргинина) и других препаратов нового поколения [2–5]. Для отдельных метаболических регуляторов успешно завершены I и II фазы клинических исследований.

Ранее нами установлена способность акадезина (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) — агониста AMPK — вызывать неапоптотическую гибель опухолевых клеток при минимальном повреждении неопухолевых [6]. Действие акадезина показано на различных моделях: он подавлял пролиферацию клеток ретинобластомы [7], нейробластомы [8], рака поджелудочной железы [9], гепатомы [10], меланомы [11], В-лимфоцитарного лейкоза [12] и РМЖ [13]. Акадезин вызывал торможение роста трансплантатов ретинобластомы у бестимусных мышей на ~ 50 % [14]. O.S. El-Masry и соавт. обнаружили, что чувствительность клеток РМЖ к акадезину зависит от гистологической принадлежности. Так, в клетках линии T47D акадезин вызывает задержку клеточного цикла, а в клетках линий MCF-7 и MDA-MB-231 наблюдаются признаки апоптоза [13].

Акадезин активирует AMPK — основной внутриклеточный метаболический сенсор. Для AMPK-зависимой гибели необходима LKB-1 (liver kinase B1) — серин-треониновая протеинкиназа, фосфорилирующая AMPK [15]. В неопухолевых клетках основная роль AMPK заключается в перестройке метаболизма на время накопления аденозинмонофосфата (АМФ)/дефицита аденозинтрифосфата (АТФ), в частности усиливаются окисление жирных кислот и гликолиз. Одновременно с этими процессами низкое содержание АТФ вызывает замедление пролиферации до восстановления энергетического пула. Несколько сложнее устроена регуляция AMPK в опухолевой клетке. С одной стороны, дефицит АТФ «переключает» клетку на режим голодания (усиление гликолиза, блокирование mTOR-сигнального пути и т.д.), с другой, вследствие злокачественной трансформации не происходит остановки пролиферации, и это определяет возможность апоптоза после истощения запаса питательных веществ. Акадезин, являющийся миметиком АМФ, приводит опухолевую клетку в состояние «мнимого» голодания, которое заканчивается различными формами клеточной гибели (в зависимости от гистологического типа опухоли) [6, 13]. В качестве объяснения AMPK-индуцированной гибели

опухолевых клеток часто рассматривают участие этой киназы в p53-опосредованных каскадах. AMPK фосфорилирует p53 по серину 15, что, в свою очередь, приводит к стабилизации белка и его накоплению в митохондриях [16–18]. Фосфорилированный p53 индуцирует высвобождение проапоптотического белка BAK из комплекса с Bcl-xL с последующим усилением апоптоза и, соответственно, чувствительности клетки к химиотерапевтическим агентам [19, 20].

Среди белков-партнеров AMPK, регулирующих выживаемость опухолевых клеток при действии противоопухолевых препаратов, важную роль играет транскрипционный фактор, опосредующий эффекты гипоксии (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1α) [21, 22]. На линии рака предстательной железы DU145 показано, что AMPK участвует в регуляции HIF-1α-зависимых процессов [21]. В. Faubert и соавт. обнаружили значительное снижение экспрессии HIF-1α в клетках с подавленной экспрессией AMPK [23], однако данные о действии агонистов AMPK (метформин, акадезин) на активность HIF-1α отсутствуют. Мы предположили, что акадезин влияет на активность HIF-1α в клетках РМЖ и регулирует их выживаемость.

Материалы и методы

Линии клеток и культивирование. Клетки РМЖ человека линий MCF-7, HCC1395 и MDA-MB-231 получены из American Type Culture Collection (США) и хранились в криобанке РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Идентичность линий подтверждали с помощью анализа коротких tandemных повторов (GORDIZ, Россия). Линии MCF-7, HCC1395 и MDA-MB-231 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, ПанЭко, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (HyClone, США), пируват натрия (0,11 мг/мл) (ПанЭко, Россия) и 50 ед./мл гентамицина (ПанЭко, Россия), при температуре 37 °С в 5 % CO₂ при относительной влажности 80–85 %. В экспериментах использовали культуры в логарифмической стадии.

Оценка цитотоксичности. Этот показатель определяли в МТТ-тесте, основанном на восстановлении жизнеспособными клетками 3-[4,5-диметилтиазол-2]-2,5-дифенилтетразолбромидом [24]. Значение IC₅₀ (концентрация препарата, при которой выживает 50 % клеток) вычисляли в GraphPad Prism методами нелинейной регрессии. Исследования влияния гипоксии на клетки РМЖ проводили в двухгазовом инкубаторе Binder (Германия) с возможностью снижения парциального давления кислорода до 1 %.

Оценка HIF-1α-зависимой трансактивации гена-репортера. Для определения транскрипционной активности HIF-1α клетки линии MCF-7 трансфицировали плазмидой, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем респонсивного элемента, активируемого гипоксией (hypoxia response element,

HRE-LUC). Плазмида HRE-LUC была предоставлена G. Melillo [25]. Для трансфекции использовали Metafectene PRO (Biontex Laboratories, Германия). Для котрансфекции использовали плазмиду, содержащую ген β -галактозидазы под контролем промотора цитомегаловируса (pCMV- β -gal). Активность этого промотора не регулируется гипоксией. Определение активности люциферазы проводили на планшетном люминометре TECAN Infinite M200Pro (Promega, США) согласно рекомендациям производителя; уровень β -галактозидазы определяли по стандартному протоколу на анализаторе MultiScanFC (ThermoScientific, США). HIF-1 α -зависимую трансактивацию выражали в условных единицах как отношение активности люциферазы к активности β -галактозидазы. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Каждый опыт воспроизводили не менее 3 раз. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ DATAPLOT и GraphPad Prism.

Иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга клетки на стадии 80 % монослоя лизировали в 150 мкл буфера следующего состава: 50 мМ Трис-HCl pH 7,4, 1 % Igepal CA-630, 150 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтетраацетата, 1 мМ дитиотрейтола, по 1 мкг/мл апропинина, леупептина и пепстатина, по 1 мМ фторида натрия и ортованадата натрия. Образцы инкубировали на льду 20 мин, затем центрифугировали (10000g, 10 мин, при температуре 4 °C), проводили электрофорез в 10 % полиакриламидном геле, перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану и иммуноблоттинг. Содержание общего и фосфорилированного AMPK и mTOR определяли с помощью антител Cell Signaling Technology (США). Детекцию выполняли с вторичными антителами к иммуноглобулину кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США) в системе для анализа LAS 4000 (GE HealthCare, США).

Результаты и обсуждение

Цитотоксическое действие акадезина на клетки РМЖ. Акадезин получали микробиологическим способом с использованием оригинального рекомбинантного штамма [26]. Цитотоксическое действие акадезина анализировали на 3 линиях РМЖ: клетки гормонозависимого рака MCF-7, трижды негативного рака MDA-MB-231 и HCC1395. МТТ-тест, проведенный после 72-часовой инкубации клеток, показал, что IC₅₀ акадезина для клеток MCF-7 (люминальный А подтип рака) составляет 0,28 мМ. Клетки трижды негативного рака MDA-MB-231 также чувствительны к акадезину: для этой линии значение IC₅₀ составило 0,05 мМ, для другой линии трижды негативного РМЖ HCC1395 — 0,86 мМ (средние величины по результатам 3 независимых экспериментов). Таким образом, акадезин демонстрирует достаточно высокую активность в отношении РМЖ различных молекулярных подтипов.

Акадезин, AMPK и гипоксия. В клетках акадезин превращается в фосфорилированный метаболит, ZMP (5-амино-1- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид-монофосфат). Накопление ZMP приводит к индукции AMPK — сенсора изменений соотношения АМФ:АТФ. Ранее показано непосредственное участие AMPK в ответе клеток на гипоксию [21]. Мы предположили, что гипоксия может модулировать действие акадезина на AMPK-контролируемые процессы в клетках РМЖ.

Методом иммуноблоттинга установлено, что в нормоксии акадезин вызывает незначительное накопление фосфорилированной (активированной) формы AMPK в клетках линии MCF-7 (рис. 1). В условиях гипоксии акадезин — более сильный активатор AMPK. При действии акадезина не выявлено изменений активности протеинкиназы mTOR (mammalian target of rapamycin), одного из возможных эффекторов AMPK. Это может свидетельствовать об активации других сигнальных путей в клетках РМЖ в обход mTOR.

Влияние акадезина на HIF-1 α -зависимую трансактивацию. Активация транскрипционного фактора HIF-1 α — важнейший механизм адаптации опухоли к гипоксии [27, 28]. HIF-1 α -зависимые сигналы опосредуют выживание опухоли в гипоксии. В частности, HIF-1 α регулирует накопление фактора роста эндотелия сосудов в опухоли и стимуляцию неоангиогенеза [29]. Оценку влияния акадезина на HIF-1 α -зависимую транскрипцию проводили с помощью репортерного анализа. Клетки линии MCF-7 трансфицировали плазмидой, несущей ген люциферазы под контролем HIF-1 α -чувствительного промотора. Через 24 ч после трансфекции клетки помещали в инкубатор с содержанием 1 % кислорода. Через 8 ч измеряли активность люциферазы (см. Материалы и методы). На рис. 2 показано, что акадезин в относительно низких концентрациях (начиная с 0,12 мМ) снижает HIF-1 α -опосредованную трансактивацию. С увеличением концентрации акадезина падение активности HIF-1 α нарастает; при 2 мМ акадезина трансактивирующая

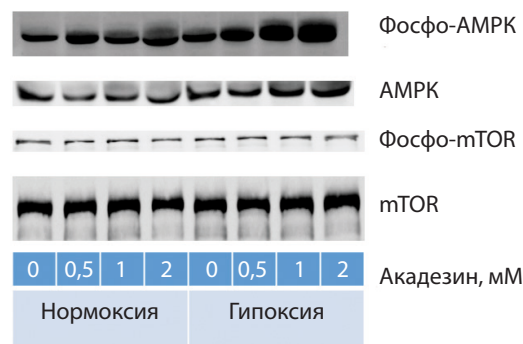


Рис. 1. Гипоксическая активация AMPK — основной мишени акадезина. Клетки линии MCF-7 инкубировали с указанными дозами акадезина в нормоксии или гипоксии (1 % кислорода) в течение 24 ч. Экспрессию белков определяли методом иммуноблоттинга. AMPK — аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа (adenosine monophosphate-activated protein kinase)

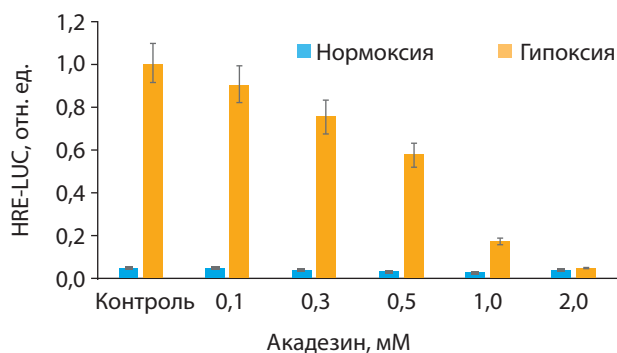


Рис. 2. Ингибирование акадезином индуцированной активности HIF-1 α . Клетки MCF-7 трансфецировали плазмидой, несущей ген-репортер (люциферазу) под контролем HIF-1 α -чувствительного промотора. Для контроля изменений генной транскрипции, независимых от гипоксии, использовали котрансфекцию клеток плазмидой pCMV- β -gal (см. Материалы и методы). HIF-1 α активировали 8-часовой инкубацией клеток в атмосфере с 1 % кислорода. HIF-1 α -зависимую транскрипцию выражали в условных единицах как отношение активности люциферазы к активности β -галактозидазы в лизатах клеток

способность HIF-1 α не отличается от таковой в нормоксии (отсутствие гипоксической индукции). Таким образом, акадезин эффективно ингибирует сигнальный, опосредованный HIF-1 α , — механизм, важный для выживаемости опухолевых клеток при пониженном содержании кислорода.

Устойчивость клеток РМЖ к действию цисплатина в гипоксии. Снижение оксигенации приводит к значительным метаболическим изменениям в опухолевой клетке: активируются гипоксические сигнальные пути (HIF-1 α , VEGF/VEGFRs, FGF, PDGF), усиливаются гликолиз и активность транспортеров глюкозы [29–31]. Вследствие этих изменений при гипоксии может снижаться чувствительность опухоли к химиопрепаратам. На рис. 3 показано, что инкубация клеток линии MDA-MB-231 в атмосфере с 1 % кислорода снижает цитотоксичность цисплатина. Учитывая высокую активность акадезина как индуктора AMPK и ингибитора HIF-1 α в гипоксии, мы предположили, что с его помощью возможно повысить чувствительность клеток к цисплатину. Комбинация цисплатина с акадезином была эффективна и в нормоксии, и в гипоксии: после 72 ч инкубации выжило менее 30 % клеток. При этом

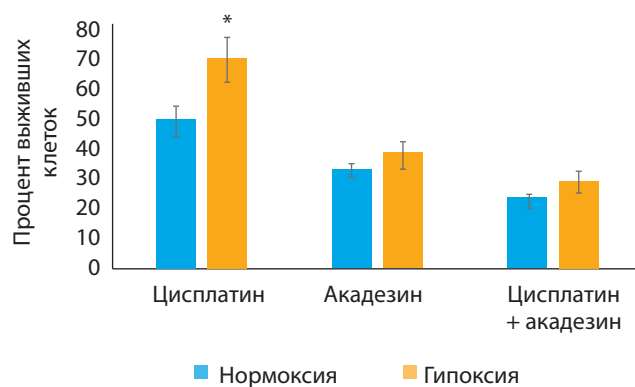


Рис. 3. Эффекты акадезина на выживаемость клеток рака молочной железы в гипоксии и в присутствии цисплатина. Данные МТТ-теста через 72 ч инкубации клеток линии MDA-MB-231 в нормоксии (21 % кислорода) или гипоксии (1 % кислорода); цисплатин (15 мкМ), акадезин (0,25 мМ); * $p < 0,05$ по сравнению с действием цисплатина в нормоксии

акадезин повышает цитотоксичность цисплатина в гипоксии практически до соответствующего показателя в нормоксии, т. е. отменяет вызванное гипоксией повышение выживаемости клеток с цисплатином.

Заключение

В целом представленные данные свидетельствуют о том, что акадезин участвует в регуляции сигнальных путей AMPK/HIF-1 α , поддерживающих выживание клеток РМЖ в гипоксии. Комбинирование с акадезином позволяет повысить цитотоксичность цисплатина. Этот результат особенно важен, так как при гипоксии эффективность цисплатина ограничена. Таким образом, обоснована перспективность использования акадезина для снижения выживаемости клеток РМЖ в условиях гипоксии. Один из механизмов такой сенситизации — блокирование акадезином HIF-1 α -зависимых молекулярных каскадов. С учетом значительной роли HIF-1 α в усилении экспрессии VEGF-A соответственно, в развитии и поддержании сети внутриопухолевых сосудистых капилляров [32] высокую эффективность может показать комбинация антиангиогенной терапии и акадезина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fitzmaurice C., Dicker D., Pain A. et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* 2015;1(4): 505–27.
2. Liu H.Y., Li Q.R., Cheng X.F. et al. NAMPT inhibition synergizes with NQO1-targeting agents in inducing apoptotic cell death in non-small cell lung cancer cells. *Chin J Nat Med* 2016;14(8):582–9.
3. Szlosarek P.W., Steele J.P., Nolan L. et al. Arginine deprivation with pegylated arginine deiminase in patients with argininosuccinate synthetase 1-deficient malignant pleural mesothelioma: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2016;3(1):58–66.
4. Miraki-Moud F., Ghazaly E., Ariza-McNaughton L. et al. Arginine deprivation using pegylated arginine deiminase has activity against primary acute myeloid leukemia cells *in vivo*. *Blood* 2015;125(26):4060–8.
5. Khan A., Andrews D., Blackburn A.C. Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. *World J Clin Cases* 2016;4(10):336–43.
6. Glazunova V.A., Lobanov K.V., Shakulov R.S. et al. Acadesine triggers non-apoptotic death in tumor cells. *Acta Naturae* 2013;5(3):74–8.
7. Theodoropoulou S., Kolovou P.E., Morizane Y. et al. Retinoblastoma cells are inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase. *FASEB J* 2010;24(8):2620–30.

8. Garcia-Gil M., Pesi R., Perna S. et al. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience* 2003;117(4):811–20.
9. Kefas B.A., Heimberg H., Vaulont S. et al. AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 2003;46(2):250–4.
10. Meisse D., van de Castele M., Beauloye C. et al. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett* 2002;526(1–3):38–42.
11. Woodard J., Platanias L.C. AMP-activated kinase (AMPK)-generated signals in malignant melanoma cell growth and survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398(1):135–9.
12. Campas C., Lopez J.M., Santidrian A.F. et al. Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* 2003;101(9):3674–80.
13. El-Masry O.S., Brown B.L., Dobson P.R. Effects of activation of AMPK on human breast cancer cell lines with different genetic backgrounds. *Oncol Lett* 2012;3(1):224–8.
14. Theodoropoulou S., Brodowska K., Kayama M. et al. Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) inhibits the growth of retinoblastoma in vivo by decreasing angiogenesis and inducing apoptosis. *PLoS One* 2013;8(1):e52852.
15. Song X., Huang D., Liu Y. et al. AMP-activated protein kinase is required for cell survival and growth in HeLa-S3 cells *in vivo*. *IUBMB Life* 2014;66(6):415–23.
16. Nieminen A.I., Eskelinen V.M., Haikala H.M. et al. Myc-induced AMPK-phospho p53 pathway activates Bak to sensitize mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(20):E1839–48.
17. Wang Z., Wang N., Liu P. et al. AMPK and Cancer. *EXS* 2016;107:203–26.
18. Sun Y., Tao C., Huang X. et al. Metformin induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by activating an AMPK/p53/miR-23a/FOXO1 pathway. *Oncotargets Ther* 2016;9:2845–53.
19. Neise D., Graupner V., Gillissen B.F. et al. Activation of the mitochondrial death pathway is commonly mediated by a preferential engagement of Bak. *Oncogene* 2008;27(10):1387–96.
20. Dai H., Ding H., Meng X.W. et al. Constitutive Bak activation as a determinant of drug sensitivity in malignant lymphohematopoietic cells. *Genes Dev* 2015;29(20):2140–52.
21. Lee M., Hwang J.T., Lee H.J. et al. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem* 2003;278(41):39653–61.
22. Liao D., Johnson R.S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):281–90.
23. Faubert B., Boily G., Izreig S. et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*. *Cell Metab* 2013;17(1):113–24.
24. Iselt M., Holtei W., Hilgard P. The tetrazolium dye assay for rapid in vitro assessment of cytotoxicity. *Arzneimittelforschung* 1989;39(7):747–9.
25. Rapisarda A., Uranchimeg B., Sordet O. et al. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 2004;64(4):1475–82.
26. Lobanov K.V., Errais Lopes L., Korol'kova N.V. et al. Reconstruction of purine metabolism in bacillus subtilis to obtain the strain producer of AICAR: a new drug with a wide range of therapeutic applications. *Acta Naturae* 2011;3(2):79–89.
27. Ke Q., Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006;70(5):1469–80.
28. Kimbro K.S., Simons J.W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(3):739–49.
29. Schneider B.P., Miller K.D. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(8):1782–90.
30. Dimova I., Popivanov G., Djonov V. Angiogenesis in cancer — general pathways and their therapeutic implications. *J BUON* 2014;19(1):15–21.
31. Mittal K., Ebos J., Rini B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Semin Oncol* 2014;41(2):235–51.
32. Subhani S., Vavilala D.T., Mukherji M. HIF inhibitors for ischemic retinopathies and cancers: options beyond anti-VEGF therapies. *Angiogenesis* 2016;19(3):257–73.

