

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*Аллель-специфическая экспрессия
генов при канцерогенезе*

*Трансплантационный
и специфический
противоопухолевый иммунитет
в ретроспективе*

*Сигнальный путь Wnt: перспективы
фармакологического регулирования*

*Нейробластома:
морфологическая структура,
молекулярно-генетические
особенности и прогностические
факторы*

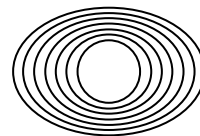
ТОМ 3 № 1
2016



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

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 3
'16

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

Редактор **Н.В. Жукова**
Корректор **В.А. Наумкина**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору

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

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.
Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.
В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.

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

Успехи молекулярной онкологии.
2016. Том 3. № 1. 1–62

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016

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

Гуревич 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 Георгиевич, 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)

Кжышкова 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 Наталия 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)

Тюлядин 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., руководитель лаборатории 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 ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (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)

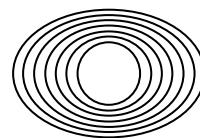
Заридзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

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.

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. 3
'16

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

Editor N.V. Zhukova

Proofreader V.A. Naumkina

Designer E.V. Stepanova

Maker-up O.V. Goncharuk

Subscription & Distribution Service

I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager R.A. Kuznetsov,

+7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

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

Technologies, and Mass Media

(III No. ФС77-57560

dated 08 April 2014).

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

The editorial board is not responsible
for advertising content.

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

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

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2016. Vol. 3.
No. 1. 1—62

© PH "ABV-Press", 2016

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the 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)
- Kzhyshkovska 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, Leading Researcher 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 Tomsk Cancer Research Institute (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)



Издательский дом «АБВ-пресс» специализируется на выпуске периодической научной медицинской литературы, книгопечатной продукции, создании и поддержке сайтов медицинского направления

НАШИ ЖУРНАЛЫ и ГАЗЕТЫ



НАШИ КНИГИ



Книги и другие наши издания можно заказать и приобрести в редакции по адресу:
г. Москва, Каширское ш., 24, стр. 15

и по телефону:
+7 (499) 929-96-19.

Адрес электронной почты:
abv@abvpress.ru

НАШИ САЙТЫ



www.abvpress.ru



www.oncoproct.ru



www.roou.ru



www.hnonco.ru



www.netoncology.ru



www.urotoday.ru



www.neuromuscular.ru



www.breastcancersociety.ru

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ*О.М. Кривцова, Н.Л. Лазаревич***Аллель-специфическая экспрессия генов при канцерогенезе 8***Д.Б. Казанский, Ю.Ю. Силаева, А.А. Калинина, М.А. Замкова,
Л.М. Хромых, Н.А. Персиянцева, Л.Х. Джолохава***Трансплантационный и специфический противоопухолевый иммунитет в ретроспективе:
новые модели, основанные на трансгенезе индивидуальных цепей Т-клеточного рецептора 14***В.В. Татарский***Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования 28***А.М. Строганова, А.И. Карселадзе***Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности
и прогностические факторы 32****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ***Н.Н. Колесников, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина, А.В. Владимирова, Р.Б. Самсонов,
А.С. Артемьева, В.И. Новик, Л.М. Берштейн, И.Ф. Жимулев, А.В. Малек***Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии
опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка 44***А.В. Суховских, Э.В. Григорьева***Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в различных типах опухолей человека 53****НЕКРОЛОГ****Памяти Фёдора Львовича Киселёва (28.12.1940–04.02.2016) 61****ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 62**

REVIEWS

O.M. Krivtsova, N.L. Lazarevich

Allele-specific gene expression in carcinogenesis 8

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

**Transplantational and specific antitumor immunity in retrospective view:
new models based on transgenesis of individual chains of T-cell receptor** 14

V.V. Tatarskiy

The Wnt signaling pathway: prospects for pharmacological regulation 28

A.M. Stroganova, A.I. Karseladze

Neuroblastoma: morphological pattern, molecular genetic features, and prognostic factors 32

EXPERIMENTAL REPORTS

*N.N. Kolesnikov, S.E. Titov, Yu.A. Veryaskina, A.V. Vladimirova, R.B. Samsonov,
A.S. Artem'eva, V.I. Novik, L.M. Bershteyn, I.F. Zhimulev, A.V. Malek*

**Improvement of accuracy and diagnostic significance of breast tumor fine-needle aspiration biopsy
by miRNA analysis of material isolated from cytological smears.** 44

A.V. Suhovskiy, E.V. Grigor'eva

Tissue-specificity of proteoglycans expression in different cancers 53

OBITUARY

In memory of Fedor L'vovich Kiselev (28.12.1940–04.02.2016) 61

INFORMATION FOR AUTHORS

..... 62

Аллель-специфическая экспрессия генов при канцерогенезе

О.М. Кривцова^{1,2}, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

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

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

В результате масштабных исследований человеческого генома, проведенных в последние годы, было установлено наличие в геномах здоровых индивидов множества вариантов последовательностей ДНК, отличных от референсной последовательности. Среди этих вариантов, подавляющую часть которых составляют герминативные однонуклеотидные полиморфизмы, обнаруживают аллельные варианты, ассоциированные с развитием заболеваний, в том числе наследственных моногенных болезней, также регистрируются менее изученные потенциально патогенные варианты. Проявление таких вариантов в фенотипе зависит не только от функциональной значимости самой мутации и содержащего ее гена, но и от уровня экспрессии измененного аллеля и может быть обусловлено преобладанием экспрессии одного аллеля гена над другим, или аллель-специфической экспрессией.

По современным оценкам аллель-специфическая экспрессия затрагивает 20–30 % генов человека и носит тканеспецифичный характер. Аллель-специфическую экспрессию определяет действие ряда генетических и эпигенетических механизмов, включая цис-регуляторные полиморфизмы, аллель-специфическое связывание транскрипционных факторов, аллель-специфическое метилирование ДНК и регуляцию некодирующими РНК.

На сегодняшний день имеются данные о роли аллель-специфической экспрессии в развитии некоторых наследственных заболеваний, в том числе наследственных форм опухолей толстого кишечника. Результаты исследований последних лет, дающие приблизительную оценку распространенности этого явления в опухолях и определяющие широкий спектр проявляющих аллельный дисбаланс генов, указывают на то, что значение аллель-специфической экспрессии для развития опухолей, вероятно, недооценено. В перспективе оценка уровней экспрессии аллельных вариантов, приводящих к нарушению функции онкогенов или опухолевых супрессоров, может оказаться значимым фактором для выбора оптимальных схем противоопухолевой терапии.

В обзоре рассматриваются предпосылки к возникновению и механизмы аллель-специфической экспрессии, а также имеющиеся в литературе данные об аллельном дисбалансе в опухолях.

Ключевые слова: аллель-специфическая экспрессия, герминативные мутации, регуляция транскрипции, эпигенетические механизмы, однонуклеотидные полиморфизмы, канцерогенез, семейный аденоматозный полипоз, синдром Линча

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-08-13

Allele-specific gene expression in carcinogenesis

O.M. Krivtsova^{1,2}, N.L. Lazarevich^{1,2}

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

²Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninsky Gory St., Moscow, 119234, Russia

Recent large-scale genomic studies established the occurrence of multiple DNA sequence variants in genomes of healthy individuals that differ from the reference sequence. Among these variants mostly represented by germline single nucleotide polymorphisms disease-related alleles are detected including alleles which are associated with monogenic disorders, and putative deleterious genetic variants. Apart from functional significance of a particular variant and of a gene harboring it, the penetrance of these allelic variants depends on their expression level and can be determined by preferential expression of a particular allele, or allele-specific expression. It is estimated that 20–30 % of genes present in the human genome display allelic bias in a tissue-specific manner. Allele-specific expression is defined by a range of genetic and epigenetic mechanisms including cis-regulatory polymorphisms, allele-specific binding of transcription factors, allele-specific DNA methylation and regulation through non-coding RNA.

Although the data on the issue are scarce, allele-specific expression has been reported to be implicated in several hereditary disorders including benign and malignant tumors of the large intestine. Recent studies that estimate allele-specific expression incidence in tumors and identify wide range of genes displaying allelic imbalance indicate that allele-specific expression might play a significant role in carcinogenesis. Eventually, estimation of transcriptional rate of allelic variants which cause dysfunction of oncogenes and tumor suppressors may prove to be essential for rational choice of antitumor therapeutic strategy. In this review, we outline the main concepts and mechanisms of allele-specific expression and the data on allelic imbalance in tumors.

Key words: allele-specific gene expression, germline mutations, transcriptional regulation, epigenetic mechanisms, single nucleotide polymorphisms, carcinogenesis, familial adenomatous polyposis, Lynch syndrome

Введение

Инициация и прогрессия опухолей являются результатом накопления мутаций в геноме клетки. Соматические мутации возникают *de novo* в соматических клетках организма и считаются основными драйверами канцерогенеза, в то время как герминативные мутации происходят в гаметках, передаются потомству и могут определять предрасположенность к развитию определенных форм опухолей. Мутации носят характер однонуклеотидных замен, инсерций и делеций сегментов ДНК различной протяженности (инделов), хромосомных перестроек в результате репарации двуниевых разрывов негомологичных хромосом, амплификаций и делеций участков хромосом [1].

Наиболее часто в геноме встречаются герминативные однонуклеотидные замены, или полиморфизмы, которые селективно поддерживаются в популяции. Частота встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов в некодирующих участках генома выше, чем в кодирующих. По оценке проекта «1000 геномов» обнаруживается, что только в кодирующей части генома каждого индивида содержится в среднем 10–11 тыс. несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов (приводящих к замене аминокислоты в кодируемом белке) и примерно столько же синонимичных по сравнению с референсным геномом человека. Кроме того, в каждом геноме выявляется около 200 инделов, 80–100 вариантов, определяющих возникновение стоп-кодонов, 40–50 вариантов, нарушающих сайты сплайсинга, и 220–250 делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания [2]. Частота встречаемости минорных аллелей, содержащих однонуклеотидные полиморфизмы, в популяции составляет чуть более 1 % [3].

Масштабные исследования последних лет с использованием высокопроизводительных методов секвенирования привели к обнаружению в геномах здоровых индивидов множества герминативных полиморфных вариантов последовательностей ДНК, приводящих к утрате белком, кодируемым затрагиваемым геном, своей функции (loss-of-function, LoF) или нонсенс-опосредованному разрушению и другим патогенным вариантам. По последним оценкам геном человека в среднем содержит около 100 герминативных LoF-вариантов в виде однонуклеотидных полиморфизмов и инделов, что приводит к полной инактивации примерно 20 генов. Среди таких полиморфизмов встречаются варианты, ассоциированные с развитием заболеваний, включая наследственные моногенные болезни, а также менее изученные потенциально патогенные варианты, функциональное значение которых может быть предсказано с помощью биоинформатических методов [4]. Поскольку организм человека гетерозиготен по 80 % таких полиморфных генов [4], конкретный фенотипический эффект LoF-варианта зависит не только от функциональной значимости гена, но и от уровня экспрессии его измененного аллеля.

В большинстве случаев экспрессия гена осуществляется в равной степени с обеих гомологичных хромосом. Для ограниченного числа генов характерен импринтинг, при котором эпигенетическими механизмами инактивируется один из родительских аллелей гена. Нарушение импринтинга некоторых генов, в частности инсулиноподобного фактора роста *IGF2* (например, его утрата), может приводить к развитию ряда заболеваний, включая колоректальный рак и рак молочной железы [5].

Помимо би- и моноаллельной экспрессии гена возможна аллель-специфическая экспрессия, под которой понимают неравновесное соотношение уровней экспрессии аллелей гена, когда один аллель экспрессируется в 2–4 раза интенсивнее другого [6].

Ниже мы рассмотрим предполагаемые механизмы аллель-специфической экспрессии, а также текущее состояние исследований по проблеме аллельного дисбаланса в опухолях.

Аллель-специфическая экспрессия и ее механизмы

По разным оценкам аллель-специфическая экспрессия затрагивает от 20 до 30 % генов человека [6, 7]. Она может носить тканеспецифичный характер, при этом паттерны такой экспрессии ближе всего в тканях, имеющих сходную функцию или общее происхождение [6].

Главным образом аллель-специфическая экспрессия зависит от положения полиморфизма и типа замены. Вероятно, что экспрессия аллелей, играющих роль в патогенезе заболеваний, в норме может быть снижена вне зависимости от других характеристик, влияющих на их экспрессию. Например, полиморфизм в экзоне 4 гена *FMO3*, кодирующего флавиносодержащую монооксигеназу — фермент, необходимый для метаболизма ксенобиотиков, — приводит к нарушению каталитической активности фермента и ассоциирован с развитием триметиламинурии. Экспрессия полиморфного аллеля снижена во всех тканях организма здорового человека, причем наименьший ее уровень наблюдается в печени [6].

Аллель-специфическая экспрессия может быть вызвана рядом причин. Наиболее распространенными, по-видимому, являются цис-регуляторные полиморфизмы в некодирующих участках гена (промоторах, интронах или 3'-нетранслируемых областях). Такие полиморфизмы способны влиять на инициацию, скорость транскрипции, альтернативный сплайсинг или стабильность транскрипта конкретного аллеля [7]. В литературе описано аллель-специфическое связывание транскрипционных факторов, в частности NF-κB и CTCF, в случаях, когда полиморфизм затрагивает связывающие их мотивы, повышая аффинность транскрипционного фактора к сайту связывания и тем самым изменяя уровень экспрессии гена [8, 9].

Полиморфизмы, находящиеся за сайтом терминации транскрипции, способны влиять на аллель-спе-

цифичность экспрессии путем посттранскрипционной регуляции экспрессии гена, поскольку потенциально способны препятствовать связыванию микроРНК, комплементарной участку в 3'-нетранслируемой области мРНК, приводя к увеличению уровня экспрессии содержащего такой полиморфизм аллеля либо образовывать новые сайты связывания [10].

Примечательно, что, по данным проектов полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS), большинство однонуклеотидных полиморфизмов, связанных с развитием известных заболеваний, находятся в межгенных участках и интронах (43 и 45 % соответственно), а также в 3'-нетранслируемых областях [11].

Гены, имеющие LoF-вариант в одном из аллелей, часто проявляют аллель-специфический характер экспрессии. Образовавшийся в результате возникновения обусловленного полиморфизмом преждевременного стоп-кодона укороченный вариант транскрипта может подвергнуться нонсенс-опосредованному разрушению, привести к нарушению альтернативного сплайсинга или транслироваться в доминантно-негативную изоформу белка [12]. Например, не подверженные нонсенс-опосредованному разрушению транскрипты нескольких редких аллелей гена, кодирующего β -глобин, транслируются в укороченный нефункциональный белок, преципитируются и, будучи нерастворимыми, перегружают протеолитическую систему [13]. К выраженным клиническим проявлениям заболеваний чаще приводит образование подобных изоформ по сравнению со снижением экспрессии гена вследствие нонсенс-опосредованного разрушения, поскольку продукция доминантно-негативных укороченных белков может иметь более явные функциональные нарушения, нежели вызываемое разрушением транскриптов снижение экспрессии генов [14]. В случае гаплонедостаточности гена, имеющего LoF-вариант или преждевременный стоп-кодон в одном из аллелей, вероятность развития патологии существенно возрастает. Так, при нейрофиброматозе 1-го типа — аутосомно-доминантном заболевании, обусловленном LoF-полиморфизмом одного из аллелей гена *NFI*, кодирующего опухолевый супрессор нейрофибромин, — у 80 % пациентов обнаруживается преобладание экспрессии полиморфного аллеля. В клиническую картину заболевания входят развитие нейрофибром, глиом зрительного нерва, дисплазии костной ткани и некоторые другие проявления. Исследование наследственной формы нейрофиброматоза 1-го типа, на долю которой приходится 50 % случаев заболевания, позволяет предположить наличие зависимости между степенью выраженности симптомов у конкретного пациента и соотношением уровней экспрессии нормального и полиморфного аллелей *NFI* [15].

Тем не менее результаты исследования, проведенного М.А. Rivas и соавт. на выборке, которая включала более 600 человек, указывают на то, что компенсатор-

ное повышение экспрессии функциональных аллелей генов человека, содержащих LoF-мутации, не способно в достаточной степени восстановить необходимый уровень экспрессии гена [12].

Описана возможность эпигенетической регуляции аллель-специфической экспрессии путем аллель-специфического метилирования ДНК, частота которого близка к частоте аллель-специфической экспрессии, наблюдаемой в геноме человека. Это позволяет предположить, что в качестве их причин выступают одни и те же цис-регуляторные варианты. Кроме того, показано, что 38–88 % сайтов аллель-специфического метилирования зависят от наличия в CpG-островках полиморфизмов, нарушающих метилирование этих участков [16, 17]. Поскольку мутации в CpG-островках являются достаточно частым событием [17], аллель-специфическое метилирование может определять индивидуальные различия в паттернах аллель-специфической экспрессии.

К аллель-специфической экспрессии также может приводить аллель-специфическая модификация гистонов, однако с большей частотой участки такой модификации колокализуются с импринтированными генами [18].

Аллель-специфическая экспрессия генов в опухолях

Впервые роль аллель-специфической экспрессии в процессе канцерогенеза была установлена для гена *APC*, кодирующего негативный регулятор сигнального каскада Wnt, у пациентов, страдающих семейным аденоматозом толстой кишки. Семейный аденоматоз толстой кишки — аутосомно-доминантное заболевание, причиной которого является герминативная мутация в *APC*, приводящая к развитию множества аденоматозных полипов в толстой кишке и их прогрессии в колоректальный рак в молодом возрасте. При данном заболевании можно наблюдать образование полипов в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, десмоидов и других внекишечных новообразований [19]. Известно более 700 вариантов герминативных мутаций в гене *APC*, большинство из которых приводит к появлению преждевременного стоп-кодона. Тем не менее у части пациентов мутации в экзонах, 3'-нетранслируемой области или промоторе гена не обнаруживаются [19]. Н. Yan и соавт. описали двукратное снижение экспрессии одного из аллелей гена *APC*, которое повышает предрасположенность к развитию опухолей у людей, страдающих семейным аденоматозом толстой кишки. Посредством секвенирования в указанном аллеле *APC* были выявлены только ранее описанные полиморфизмы. При прогрессировании заболевания в большинстве неопластических опухолей происходила утрата гетерозиготности за счет характеризующегося высоким уровнем экспрессии аллеля при сохранении в геноме варианта с низким уровнем экспрессии [20].

В нескольких работах рассматривается влияние эпигенетических механизмов на развитие синдрома Линча — наследственного колоректального рака без

полипоза. Это аутосомно-доминантное заболевание характеризуется ранним (у 1/3 пациентов мультифокальным) развитием колоректального рака. В спектр ассоциированных с синдромом Линча патологий также входит рак эндометрия, почечной лоханки, мочевого пузыря, желудка, тонкой кишки, яичников, мозга и билиарного тракта [21]. Синдром Линча обычно обусловлен мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, отвечающих за репарацию неправильно спаренных оснований [22, 23].

Исследование эпителия слизистой оболочки прямой кишки 12 членов одной семьи, носителей 2 полиморфизмов в позициях –118 и –433 от сайта начала транскрипции гена *MSH2*, в 10 случаях выявило метилирование промотора *MSH2*, которое не наблюдалось в образцах слизистой оболочки людей, страдающих sporadic формой колоректального рака, имеющих колоректальные аденомы, а также здоровых людей. Метилирование промотора *MSH2* носило аллель-специфический характер и было связано с аллелем Т в –118 и аллелем Г в –433 положении. Наличие аллеля Г в позиции –433 от сайта начала транскрипции гена *MSH2* приводило к метилированию аллеля в 43–75 % случаев в толстом кишечнике в нормальной ткани и в 82 % случаев в опухолевой ткани. При этом в лейкоцитах носителей полиморфизмов наблюдали низкий уровень метилирования указанного аллеля, сравнимый с уровнем метилирования промотора *MSH2* у здоровых лиц [22].

При герминативных делециях последних экзонов одного из аллелей гена *TACSTD1*, расположенного с 5'-конца от гена *MSH2*, происходит отмена нормальной терминации транскрипции, также приводящая к метилированию промотора *MSH2*. *TACSTD1* кодирует белок ЕрСAМ, формирующий гомотипические адгезионные контакты между эпителиальными клетками. Поскольку экспрессия *TACSTD1* тканеспецифична, метилирование одного из аллелей *MSH2*, вызванное делецией в *TACSTD1*, обнаруживается только в ЕрСAМ-положительных тканях и повышает вероятность развития опухолей в них [23].

Масштабное исследование аллель-специфической экспрессии генов при остром лимфобластном лейкозе проведено L. Milani и соавт. Дифференциально экспрессируемые аллельные варианты, выявленные при исследовании образцов клеток костного мозга и крови 197 пациентов (дети с впервые диагностированным заболеванием), были отобраны по следующим критериям: отсутствие хромосомных aberrаций в соответствующих им локусах и наличие дисбаланса в экспрессии одинаковых аллелей в 8 и более образцах. Из 400 выбранных таким образом генов, содержащих 470 полиморфизмов, экспрессия примерно половины из них, в том числе расположенных на X-хромосоме, носила моноаллельный характер. Только у 45 % проявивших аллель-специфическую экспрессию генов во всех образцах оказался гиперэкспрессирован один и тот же

аллель, что указывает на наличие в них цис-регуляторных полиморфизмов. Большинство генов, при экспрессии которых выявлялся аллельный дисбаланс, кодировали белки, обеспечивающие процессирование и представление (презентацию) антигенов, процессы межклеточной адгезии и контакты с внеклеточным матриксом (например, синдекан-2, гиперэкспрессию которого наблюдают в нескольких типах опухолей), а также матриксные белки. Высокая корреляция аллельного дисбаланса экспрессии генов и метилирования CpG-островков в их промоторах или первых интронах указывает на способность полиморфизмов влиять на аллель-специфическое метилирование [16].

При исследовании 3 случаев плоскоклеточного рака полости рта выявлена аллель-специфическая экспрессия генов белков клеточной адгезии, промежуточных филаментов, регуляторов дифференцировки. Так, аллельный дисбаланс описан для экспрессии гена *PERP*, кодирующего р53-зависимый эффектор апоптоза; гена *MALAT1*, транскрипт которого является предшественником длинной некодирующей РНК, регулирующей транскрипцию генов, ответственных за миграцию, метастазирование и контроль клеточного цикла; гена *RUNX1*, кодирующего транскрипционный фактор, регулирующий дифференцировку гемопоэтических клеток и ассоциированный с развитием острого миелоидного лейкоза; гена *ZFP36L1*, кодирующего транскрипционный фактор, который предположительно модулирует экспрессию мишеней в ответ на воздействие факторов роста. Некоторые аллель-специфически экспрессирующиеся при плоскоклеточном раке полости рта гены описаны в литературе как дифференциально экспрессирующиеся гены при меланоме, фолликулярной лимфоме и плоскоклеточном раке легкого [24].

При исследовании клеточных линий миеломы, Т-клеточного лейкоза, мелкоклеточного рака легкого, гистиоцитарной лимфомы, рака шейки матки и их производных, обладающих лекарственной устойчивостью, L. Milani и соавт. обнаружили аллельный дисбаланс экспрессии ряда ассоциированных с канцерогенезом и определяющих лекарственную устойчивость генов, в том числе *APC*, *ABCC3*, *BCL2*, *BRCA1*, *CCND2*, *MLH1*, *SLIT2*, *PARP1*, *TNFRSF12A* и *YES1*. В промоторах *APC*, *BCL2*, *CCND2*, *MLH1*, *PARP1*, *SLIT2* и *YES1* выявлены цис-регуляторные полиморфизмы, обуславливающие аллель-специфическое связывание транскрипционных факторов [25].

В рамках другой работы было проведено секвенирование генома и транскриптома 18 линий клеток немелкоклеточного рака легкого и нескольких пар образцов нормальной и опухолевой ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого и гепатоцеллюлярной карциномой. Доля генов, для которых выявлена аллель-специфическая экспрессия, в опухолях и линиях опухолевых клеток оказалась значительно выше, чем в нормальной ткани. Тем не менее более 65 % ге-

нов, проявляющих аллель-специфический характер экспрессии в культурах опухолевых клеток, и более 55 % таких генов в образцах опухолевой ткани находились в дуплицированных и амплифицированных участках хромосом или, напротив, наблюдалось снижение их копийности. Обнаружен аллельный дисбаланс экспрессии *TP53*, *KRAS*, *MTOR* и ряда других онкогенов и опухолевых супрессоров, нарушение функции которых ассоциировано с канцерогенезом [26].

Заключение

Хотя проблема аллель-специфической экспрессии остается малоизученной, имеющиеся в литературе данные о масштабах аллельного дисбаланса (в том числе не связанного с хромосомными aberrациями) в опухолях указывают на то, что это явление может играть значимую роль в канцерогенезе, и в первую очередь в развитии наследственно обусловленных форм опухолей. Неравномерность экспрессии аллельных вариантов в опухолевых клетках свидетельствует о том, что помимо анализа клинически значимых нарушений структуры ДНК целесообразно проводить оценку уровней экспрессии мутантных аллелей, прежде всего в случаях, когда нарушение функции затрагиваемого ими гена является показанием для назначения той или иной схемы противоопухолевой терапии.

Развитие этой области исследований на сегодняшний день ограничено рядом факторов, к которым, помимо технических, связанных со сложностью выявления низкоэкспрессируемых аллелей [26], относятся следующие.

- Небольшие выборки панелей образцов, доступные исследователям, не позволяют обнаруживать значимые для канцерогенеза редко встречаемые аллели.
- Отсутствуют унифицированные алгоритмы выявления аллель-специфической экспрессии, что приводит к существенным различиям в результатах, затрудняющим их сопоставление (например, доля генов, экспрессия которых в норме носит аллель-специфический характер, по разным данным, варьирует от 0,5 [26] до 20–30 % [6, 7]).
- Подобные исследования редко сопровождаются экспериментальной верификацией результатов как в части подтверждения соотношения уровней экспрессии аллелей методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции, так и в части установления функционального значения гиперэкспрессированных аллелей и аллелей со сниженной экспрессией.

Важнейшими задачами в области аллель-специфической экспрессии являются решение перечисленных проблем, накопление информации о встречающихся с низкой частотой аллелях и ее интеграция с данными об экспрессии и функциональной значимости полиморфных вариантов. Сопоставление полученных результатов с клиническими характеристиками опухолей и результатами лечения в будущем позволит выявить неблагоприятные, ассоциированные с развитием наследственных заболеваний и имеющие прогностическую ценность аллельные варианты и более глубоко исследовать механизмы развития наследственно обусловленных форм опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. The cancer genome. *Nature* 2009;458(7239):719–24.
2. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467(7319):1061–73.
3. Erichsen H.C., Chanock S.J. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer* 2004;90(4):747–51.
4. MacArthur D.G., Balasubramanian S., Frankish A. et al. A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science* 2012;335(6070):823–8.
5. Lee M.P. Allele-specific gene expression and epigenetic modifications and their application to understanding inheritance and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819(7):739–42.
6. Kukurba K.R., Zhang R., Li X. et al. Allelic expression of deleterious protein-coding variants across human tissues. *PLoS Genet* 2014;10(5):e1004304.
7. Gaur U., Li K., Mei S., Liu G. Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms. *J Appl Genet* 2013;54(3):271–83.
8. McDaniel R., Lee B.K., Song L. et al. Heritable individual-specific and allele-specific chromatin signatures in humans. *Science* 2010;328(5975):235–9.
9. Tycko B. Allele-specific DNA methylation: beyond imprinting. *Hum Mol Genet* 2010;19(R2):R210–20.
10. Zhang W., Edwards A., Zhu D. et al. miRNA-mediated relationships between Cis-SNP genotypes and transcript intensities in lymphocyte cell lines. *PLoS One* 2012;7(2):e31429.
11. Hindorf L.A., Sethupathy P., Junkins H.A. et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(23):9362–7.
12. Rivas M.A., Pirinen M., Conrad D.F. et al. Human genomics. Effect of predicted protein-truncating genetic variants on the human transcriptome. *Science* 2015;348(6235):666–9.
13. Holbrook J.A., Neu-Yilik G., Hentze M.W., Kulozik A.E. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004;36(8):801–8.
14. Inoue K., Khajavi M., Ohya T. et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 2004;36(4):361–9.
15. Jentarra G.M., Rice S.G., Olfers S. et al. Skewed allele-specific expression of the *NF1* gene in normal subjects: a possible mechanism for phenotypic variability in neurofibromatosis type 1. *J Child Neurol* 2012;27(6):695–702.
16. Milani L., Lundmark A., Nordlund J. et al. Allele-specific gene expression patterns in primary leukemic cells reveal regulation of gene expression by CpG site methylation. *Genome Res* 2009;19(1):1–11.
17. Shoemaker R., Deng J., Wang W., Zhang K. Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. *Genome Res* 2010;20(7):883–9.

18. Prendergast J.G., Tong P., Hay D.C. et al. A genome-wide screen in human embryonic stem cells reveals novel sites of allele-specific histone modification associated with known disease loci. *Epigenetics Chromatin* 2012;5(1):6.
19. Galiatsatos P., Foulkes W.D. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2006;101(2):385–98.
20. Yan H., Dobbie Z., Gruber S.B. et al. Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet* 2002;30(1):25–6.
21. Vasen H.F., Watson P., Mecklin J.P., Lynch H.T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116(6):1453–6.
22. Chan T.L., Yuen S.T., Kong C.K. et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38(10):1178–83.
23. Ligtenberg M.J., Kuiper R.P., Chan T.L. et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of *TACSTD1*. *Nat Genet* 2009;41(1):112–7.
24. Tuch B.B., Laborde R.R., Xu X. et al. Tumor transcriptome sequencing reveals allelic expression imbalances associated with copy number alterations. *PloS One* 2010;5(2):e9317.
25. Milani L., Gupta M., Andersen M. et al. Allelic imbalance in gene expression as a guide to cis-acting regulatory single nucleotide polymorphisms in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2007;35(5):e34.
26. Mayba O., Gilbert H.N., Liu J. et al. MBASED: allele-specific expression detection in cancer tissues and cell lines. *Genome Biol* 2014;15(8):405.

Трансплантационный и специфический противоопухолевый иммунитет в ретроспективе: новые модели, основанные на трансгенезе индивидуальных цепей Т-клеточного рецептора

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

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Дмитрий Борисович Казанский kazansky1@yandex.ru

Открытия экспериментальной онкологии начала прошлого века и достижения генетики тканевой совместимости привели к разделению и последующему независимому развитию иммунологии тканевой совместимости и онкоиммунологии. Вместе с тем центральные достижения обеих дисциплин основываются на едином феномене взаимодействия Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) с молекулами главного комплекса гистосовместимости. В настоящем обзоре мы описываем историю становления идей, достижения и уникальный опыт, полученный сотрудниками лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Этот опыт свидетельствует о том, что репертуар TCR и особенности их структуры критически влияют на эффективность иммунологической защиты организма, включая иммунологический надзор над возникновением и ростом клонов злокачественных клеток. Одним из возможных путей направленного воздействия на репертуар Т-лимфоцитов является трансгенез индивидуальных цепей TCR на уровне зиготы. Функциональные последствия такого трансгенеза различны в связи с тем, что экспрессия α - и β -цепей в разной степени подчинена правилам аллельного исключения. Экспрессия α -цепей ими не контролируется и поэтому приводит к расширению репертуара TCR. Экспрессия β -цепей строго подчинена правилам аллельного исключения, в связи с чем экспрессия трансгена β -цепи приводит к образованию репертуара рецепторов, в подавляющем большинстве которых присутствует трансгенная β -цепь, сужающая разнообразие репертуара. Ранее нами были клонированы гены β - и α -цепей TCR-клеток памяти CD8⁺, специфичных к молекуле главного комплекса гистосовместимости H-2K^b. В результате их внесения в геном оплодотворенной яйцеклетки нами были получены трансгенные линии животных, которые можно использовать для моделирования взаимодействий опухолевых клеток с иммунной системой опухоленосителя. Мыши линии B10. D2 (R101) в норме отторгают клетки лимфомы EL4 в течение 12–14 дней, несмотря на то, что трансплантационные различия клеток опухоли и клеток хозяина представлены единственной молекулой гистосовместимости H-2K^b. В отличие от них животные, несущие трансгены β -цепи, имеют ослабленный иммунитет к клеткам опухоли, который приводит к их длительной персистенции в организме, сопровождающейся прогрессией, необратимой утратой опухолевыми клетками молекулы H-2K^b и гибелью животных через 2–3 мес после трансплантации им опухолевых клеток. В этой модели удастся проследить все 3 фазы взаимодействия опухоли с иммунной системой опухоленосителя — элиминацию, равновесие и ускользание, в ходе которых опухолевые клетки под давлением иммунной системы реципиента утрачивают экспрессию молекулы H-2K^b и в итоге убивают опухоленосителя. Трансгены α -цепи, напротив, ускоренно отторгают опухолевые клетки в течение 3–6 дней с динамикой вторичного иммунного ответа. В отторжение этого типа вовлечены интраэпителиальные Т-лимфоциты, обладающие свойствами резидентных клеток памяти, — неспособностью к рециркуляции, экспрессией интегрина CD103, раннего активационного антигена CD69 и промежуточным уровнем экспрессии Т-клеточных маркеров CD3 и CD8. Способность этих клеток локализоваться в тканях и быстро уничтожать опухолевые клетки делают эту субпопуляцию наиболее вероятным носителем функций иммунологического надзора.

Ключевые слова: трансплантация, противоопухолевый иммунитет, главный комплекс гистосовместимости, Т-клеточный рецептор, иммунологическая память, клонирование, аллельное исключение, иммунологический надзор

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-14-27

Transplantational and specific antitumor immunity in retrospective view: new models based on transgenesis of individual chains of T-cell receptor

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

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

Findings in experimental oncology in beginning of last century and subsequent achievements of genetics of tissue compatibility resulted in divergence of transplantational immunology and oncoimmunology. However, central achievements of both scientific fields are based on unified phenomenon of interaction between T-cell receptor (TCR) and histocompatibility molecules. In this review we describe the history of ideas, achievements and unique experience of the team of the Laboratory of Regulatory Mechanisms in Immunity at Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center for all time of existence. This experience shows that efficiency of immunological defense including immunological surveillance are critically influenced by T-cell receptor repertoire. Transgenesis of individual chains

of TCR is one of possible means to manage T-cell repertoire. Functional outcomes of transgenesis may be different due to diverse extent of dependence of α - and β -chains expression on the rules of allelic exclusion. Expression of transgenic β -chains results in the expansion of TCR repertoire diversity. Expression of β -chains is under strong control by allelic exclusion, resulting in formation of repertoire bearing mainly invariant transgenic β -chain paired with different α -chains and overall narrowing of repertoire. Earlier, we cloned genes encoding α - and β -chains of TCR of CD8⁺ memory cells specific to histocompatibility molecule H-2K^b. After introduction them in zygotes we have obtained transgenic mouse strains, which could be used for modeling of interactions between tumor cells and immune system of recipient. Normally, B10. D2 (R101) mice reject lymphoma EL4 cells in 12–14 days after transplantation, in spite of the fact, that allogeneic difference between B10. D2 (R101) (K^dI^dD^b) mice and lymphoma EL4 (H-2b) cells is only in one product of MHC, the H-2K^b molecule. Transgenics carrying β -chains of TCR displayed compromised immunity to tumor cells resulting to their long persistence, tumor progression, the loss of H-2K^b molecule and death in 2–3 months after transplantation. This model allows to see all three phases of interaction between tumor and immune system of recipient – elimination, equilibrium and escape. Against, transgenics carrying α -chain reject tumor cells much more quickly, as in secondary immune response, in 3–6 days after transplantation. This rejection was mediated by intraepithelial T lymphocytes displaying features of resident memory cells – inability to recirculation, expression of CD103 and early activation antigen CD69 and intermediate density of T-cell markers CD3 and CD8. The capability to be located in nonlymphoid tissue and quickly destroy tumor cells makes them to be the most probable candidate to perform immunological surveillance functions.

Key words: transplantation, antitumor immunity, major histocompatibility complex, T-cell receptor, immunological memory, cloning, allelic exclusion, immunological surveillance

Введение

Начало развитию современной иммунологии и генетики тканевой совместимости положили достижения экспериментальной онкологии. J. Klein в своей работе изложил историю первых открытий [1]. В начале прошлого века исследования рака не имели такого приоритета и поддержки, как в наши дни. Тем не менее уже тогда многие исследователи пытались понять, какой дефект вызывает бесконтрольный рост клеток опухоли — находится ли он исключительно в злокачественно трансформированной клетке или в организме, в котором она появилась. В попытках ответить на этот вопрос исследователи выделяли фрагменты опухолевой ткани и трансплантировали их здоровому хозяину. Но результаты, которые они получали, были крайне противоречивы. Иногда трансплантированные опухоли могли приживаться и расти в организме нового хозяина и даже поддерживаться пассивированием от одного животного другому, но затем необъяснимо и неожиданно погибали. В других случаях пересаженные опухоли вовсе не росли.

Первые открытия

Что определяет рост опухоли или его отсутствие, оставалось неясным до тех пор, пока исследователи не отметили, что животные, которых они использовали как реципиентов, имеют существенные различия. В 1901 г. Карл Йенсен занимался перевивкой карциномы легкого белым мышам. Когда животных для экспериментов не хватало, он использовал обычных диких мышей. Он был поражен четким и очевидным различием: опухоль, произошедшая из белых мышей, хорошо росла при перевивании мышам этой колонии, но совсем не росла у диких животных. Результаты этой работы были опубликованы им в 1903 г., и основной вывод заключался в том, что опухоли могут поддерживаться методом серийной трансплантации животным той же «расы», из которой опухоль произошла [2]. Ис-

следователь Лео Лёб, работавший в Пенсильванском университете в Филадельфии над проблемой инстинктивного и приобретенного поведения, стал хозяином небольшой колонии так называемых «японских вальсирующих мышей» (на самом деле происходящих из Китая, чей «танец», куда более похожий на рок-н-ролл, чем на вальс, вызывается генетическим дефектом в развитии внутреннего уха). Когда у одной из мышей развилась спонтанная опухоль, Л. Лёб, подобно К. Йенсену, попытался трансплантировать ее другим «вальсирующим» мышам и диким животным. Как и в экспериментах К. Йенсена, опухоль росла у «вальсирующих», но не диких животных. Подобно К. Йенсену, Л. Лёб не знал о генетике, чтобы сделать правильный вывод из этого эксперимента, и заключил, что успешная трансплантация опухолей зависит от «расы» реципиентов [3]. Первым исследователем, который подошел к проблеме с точки зрения генетики, был Эрнест Тайзер. Он воспроизвел результаты Л. Лёба на «вальсирующих» мышах и показал, что опухоль успешно растет у гибридов 1-го поколения обычных мышей, но не у 2-го поколения, в котором наблюдается необычное расщепление признака, не вполне соответствующее законам Менделя, что указывает на его нахождение под контролем нескольких генов [4]. Их количество можно было определить при достаточно большой статистике исследования. Когда эксперименты были завершены и воспроизведены другими группами исследователей, оказалось, что частота успешных трансплантаций в поколении F₂ может варьировать в зависимости от мышей и применяемой опухоли. Лишь около 1 % животных поколения F₂ чувствительны к росту опухоли, т. е. ее способность к росту у постороннего хозяина определяется примерно 15 генами. Отсюда следует вывод о несостоятельности попыток исследовать специфический противоопухолевый иммунитет, используя нелинейных животных и перевивание им опухолевых линий неизвестного происхождения либо

произошедших из беспородных животных. Несоблюдение этого правила неизбежно приведет к той или иной форме ответов на главные и минорные антигены гистосовместимости, не имеющие отношения к антигенам опухолей.

С. Литтл и Б. Джонсон в 1922 г. трансплантировали животным небольшие части селезенки вместо опухоли и показали, что, как и в случае с опухолью, фрагменты селезенки выживают у малой части реципиентов поколения F_2 , полученных скрещиванием 2 инбредных линий мышей [5]. Эти наблюдения открыли широкий фронт последующих исследований генетики тканевой совместимости и генетических ограничений иммунного ответа.

Законы трансплантации. Открытие главного комплекса гистосовместимости

Для успеха этих исследований решающее значение имело получение высокоинбредных линий экспериментальных животных, которые благодаря продолжительной серии близкородственных скрещиваний становились генетически идентичными. Работы по пересадке опухолей и трансплантатов кожи, проведенные в процессе их получения, позволили сформулировать 5 основных законов трансплантации.

1. Сингенные трансплантаты приживаются.
2. Аллогенные трансплантаты отторгаются.
3. Трансплантаты любой из родительских линий приживаются на гибридах поколения F_1 .
4. Трансплантаты родительской линии, пересаженные гибридам поколения F_2 или потомкам возвратного скрещивания гибридов поколения F_1 с другой родительской линией, приживаются у очень небольшой части реципиентов.

5. На гибридах поколения F_1 приживаются трансплантаты от гибридов поколения F_2 и всех последующих гибридных поколений, а также трансплантаты от потомков возвратного скрещивания.

Приживление трансплантатов у генетически идентичных индивидуумов, отторжение их при наличии генетических различий, полное доминирование восприимчивости над резистентностью, расщепление по восприимчивости и резистентности в поколениях, — все это подходит к признаку, детерминированному генами в соответствии с законами Менделя.

Ранние работы по серологической идентификации продуктов генов гистосовместимости, открытие главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) мыши H-2 и его неоднородности связаны с именем Питера Горера [6, 7]. Методом генетической изоляции H-2 послужило выведение конгенных резистентных линий, которые получают серийой возвратных скрещиваний потомков поколения F_1 с одной из родительских линий [8, 9]. К началу 1970-х годов было выведено 192 линии мышей, 104 из которых отличались по генам МНС мыши H-2, а 88 линий несли другие отличия [10]. Анализ внутрилокусных

рекомбинаций, использование рекомбинантных инбредных линий и гистогенетических методов их тестирования к концу 1970-х годов позволили исправить ошибки, допущенные в ранних работах по серологической идентификации продуктов H-2 и сформировать представление о МНС, наиболее близкое к современному. Были идентифицированы 2 локуса — K и D, кодирующие молекулы МНС класса I. Позднее был идентифицирован локус L, настолько тесно сцепленный с D, что их не удается разделить рекомбинацией [1]. Полученные чистые линии животных стали также сильным средством анализа генов, не связанных с МНС, но тем не менее существующих в аллельных формах и поэтому вызывающих иммунный ответ при межлинейных иммунизациях. Многие из них оказались важными ввиду их участия в функциях лимфоцитов или возможности их использования как гистогенетических маркеров. Одним из наиболее известных примеров может служить антиген *Thy-1*, который в течение нескольких десятилетий использовался как гистогенетический маркер Т-лимфоцитов [11]. Другой хорошо известный пример — антиген *Ly-2,3 (CD8)*, являющийся корцептором CTL и их предшественников [12].

Распознавание продуктов главного комплекса гистосовместимости рецепторами Т-лимфоцитов

Участие малых лимфоцитов тимусного происхождения в специфических ответах на аллогенные и ксеногенные опухолевые клетки стало очевидным, когда выяснилось, что мыши линии nude, имеющие генетический дефект в развитии тимуса, Т-лимфоцитов и реакций специфического клеточного иммунитета, считаются прекрасными реципиентами для перевивки не только аллогенных, но даже ксеногенных опухолевых клеток. Это обстоятельство диктует необходимость более подробного рассмотрения биологии и закономерностей функционирования Т-лимфоцитов, которые являются наиболее универсальными и изменчивыми компонентами иммунной системы. Они циркулируют через кровь и лимфатические сосуды и заселяют лимфоидные органы: тимус, селезенку и лимфатические узлы, но обнаруживаются также в коже, кишечнике и печени. Они выполняют широкий ряд функций — уничтожение измененных клеток, контроль над активностью иммунной системы, секреция регуляторных молекул, а также, возможно, и ряд других, пока неизвестных. Т-лимфоциты ответственны за многие иммунные реакции, такие как клеточно-опосредованный цитоллиз, гиперчувствительность замедленного типа, отторжение трансплантата и реакция «трансплантат против хозяина». Они также являются главным элементом ряда аутоиммунных реакций. Т-лимфоциты убивают клетки-мишени, обеспечивают «помощь» таким киллерам, активируют другие клетки иммунной системы (например, макрофаги), помогают В-лимфоцитам развить гуморальный ответ, подавляют активность

других клеток иммунной системы, секретируют цитокины, хемокины и другие медиаторы. К таким клеткам относятся: киллеры $CD8^+$, Т-хелперы и регуляторы $CD4^+$, число типов которых в последние годы возросло до 5 ($Th1$, $Th2$, $Th17$, T_{reg} , T_{FH}), или популяции активированных клеток и клеток памяти [13]. Часто различные типы Т-клеток можно различить по экспрессии некоторых поверхностных маркеров, например, Т-хелперы экспрессируют $CD4$, но не $CD8$. Инверсная картина характеризует основную популяцию киллеров.

Одним из первых в мире в этом направлении начал работать Борис Давидович Брондз, изучавший взаимодействие лимфоцитов иммунизированных животных с культурами сингенных и аллогенных клеток. В 1964 г. он описал эффект разрушения монослоев макрофагов при добавлении к ним лимфоцитов иммунизированных животных [14]. Эти исследования поднимали вопрос об антигенспецифических рецепторах цитотоксических Т-лимфоцитов и об их лигандах на клетке-мишени. Б.Д. Брондз увидел и показал связь специфической цитотоксической функции лимфоцитов с распознаванием ими продуктов МНС. В 1968 г. он продемонстрировал связь между специфичностью рецепторов эффекторных CTL и их адсорбцией на монослоях макрофагов, несущих различные антигены гистосовместимости [15]. Это открытие стало первым указанием на то, что мишенью рецепторов цитотоксических лимфоцитов со специфической функцией являются молекулы МНС [1]. В экспериментах он наглядно показал эффект, получивший позднее название прямого аллогенного распознавания. Более того, возможность разделения цитотоксических лимфоцитов в соответствии со специфичностью их рецепторов МНС стало первым прямым экспериментальным указанием на клональную организацию репертуара Т-лимфоцитов. Следует отметить, что косвенные указания на это появились в мировой литературе лишь в начале 1970-х годов, и в конце десятилетия были получены сами Т-клеточные клоны [16]. Следующий шаг в исследовании природы взаимодействия антигенспецифических рецепторов Т-лимфоцитов с молекулами гистосовместимости стал возможным, когда Б.Д. Брондз разработал метод выделения лимфоцитов, специфически прикрепившихся к монослою аллогенных макрофагов [17]. Удаление неприкрепившихся клеток и последующая обработка лимфоцитов, прикрепившихся к монослою, проназой позволяла смыть их с монослоя макрофагов и добиться существенного обогащения антигенспецифических клеток с полным сохранением ими функциональных свойств. Дальнейшие исследования привели к пониманию того, что рецепторы Т-клеток распознают молекулы гистосовместимости иначе, чем антитела. В частности, обнаружили несовпадение между эпитопами, определяемыми серологически и распознаваемыми цитотоксическими Т-лимфоцитами. В то время, как Т-лимфоциты могли распознать даже единичные аминокислотные замены

в структуре тяжелой цепи молекулы гистосовместимости класса I, возникшие в результате точечных мутаций, почти никаких различий не обнаруживали во взаимодействии этих мутантных форм с антителами, специфичными к молекуле дикого типа [1]. Иммунологи пытались описать антигенную специфичность антител, основываясь на изучении паттернов их кросс-реактивности. Когда такой же метод применили к исследованию специфичности CTL, в системе, основанной на реципрокных иммунизациях всего лишь 8 типов мутантов молекулы гистосовместимости H-2K^b, приводящих к выраженному аллогенному ответу, обнаружили несколько десятков различных паттернов кросс-реактивности, которые могли быть приписаны возникновению либо исчезновению отдельных антигенных детерминант [18]. Это противоречило как картине, выявляемой антителами, которые не могли «увидеть» различий между этими мутантами, так и чрезвычайно высокой частоте клонов Т-лимфоцитов, отвечающих на аллогенные молекулы МНС.

Б.Д. Брондз разрешил это противоречие следующим образом: в его экспериментах получалось, что обогащение популяции иммунных лимфоцитов на монослое макрофагов донора приводит к одновременному обогащению CTL, перекрестно реагирующих с другими аллельными формами молекул МНС. Эта популяция клеток составляла около 5 % CTL, реагирующих с молекулой гистосовместимости донора. Он выделил эту кросс-реактивную популяцию CTL на монослое макрофагов посторонней линии мышей и исследовал ее специфичность. По его замыслу в случае верной гипотезы о множественности антигенных детерминант результатом должна стать высокая специфичность выделенных клеток к мишеням, несущим именно ту форму посторонней молекулы гистосовместимости, которая была использована для абсорбции. Результат получился противоположный — выделенные лимфоциты активно убивали мишени, несущие молекулу гистосовместимости донора, использованного для иммунизации, и гораздо слабее мишени, несущие молекулу гистосовместимости, использованную для выделения кросс-реактивных клеток [19]. Таким образом, он показал, что кросс-реактивность в системе иммунизаций аллогенными клетками обусловлена различиями Т-клеток в аффинности их антигенсвязывающих рецепторов. Из данного наблюдения следовал вывод о лабильности иммунодоминантного эпитопа, распознаваемого рецепторами аллоспецифических CTL [20]. Структура этого эпитопа и взаимодействие с ним рецепторов CTL, очевидно, могли меняться в зависимости от последовательности аминокислот тяжелой цепи, ассоциации ее с мембраной клетки мишени или с антигенными пептидами. По идее Б.Д. Брондза структура сложного «мозаичного» эпитопа для CTL на сингенной молекуле МНС могла бы при ассоциации с каким-либо антигенным пептидом частично имитировать структуру аллогенной молекулы. С получением генетически чис-

тых линий экспериментальных животных оказалось возможным в течение неограниченного времени пересаживать опухолевые клетки от одного животного другому и получать воспроизводимые результаты.

Таким образом, первые попытки вызвать противоопухолевый иммунный ответ привели к пониманию того, что в корректной экспериментальной системе исследования противоопухолевого иммунитета трансплантационные антигены на клетках опухоли и реципиента должны совпадать. Несоблюдение этого правила дает иммунный ответ преимущественно на трансплантационные антигены, а не на антигены опухоли. К середине прошлого века это привело к разделению научных направлений, занимающихся вопросами иммунологии трансплантации и противоопухолевого иммунитета.

Экспериментальные модели противоопухолевого иммунитета

Существование противоопухолевого иммунитета впервые было продемонстрировано Л. Гроссом в 1943 г. Он показал, что саркомы, индуцированные метилхолантеном у мышей линии СЗН, можно трансплантировать мышам той же линии внутрикожно, а затем удалять хирургически либо простым наложением лигатуры и прекращением кровоснабжения опухоли. У животных, подвергнутых такой процедуре, вторичная трансплантация той же опухоли приводит к ее отторжению [21]. Убедительное доказательство существования опухолеспецифического отторжения трансплантированных опухолей было получено в 1957 г. в экспериментах Р.Т. Прена и Д.М. Мэйна, которые показали, что антигены, вызывающие отторжение опухолей, являются опухолеспецифическими и не присутствуют в нормальных тканях. Они продемонстрировали также, что иммунизация опухолевыми клетками не вызывает отторжения трансплантатов кожи и других нормальных тканей [22]. Следующее важное доказательство было получено в 1960 г. Г. Клейном и соавт., которые показали, что резистентность к опухолям, индуцированным метилхолантеном, имеет место непосредственно у так называемого аутохтонного хозяина, т. е. у животного, у которого эта опухоль была индуцирована [23]. В последующие годы было доказано, что индукция опухолеспецифической трансплантационной резистентности может быть вызвана опухолями, индуцированными другими химическими или физическими (такими, как ультрафиолет) канцерогенами, а также спонтанно возникшими опухолями [24, 25].

Отторжение опухолевых клеток или его альтернатива — рост опухоли в этой системе — по-видимому, подчиняется закону «все или ничего». За исключением высокоиммуногенных опухолей, как правило, существует пороговая доза опухолевых клеток, превышение которой приводит к опухолевому росту, остановить который иммунная система не в состоянии.

Иммуногенность опухолей в значительной мере зависит от способа их индукции, который, возможно,

тесно связан с иммуносупрессивным действием канцерогенного фактора. Известно, что наименее иммуногенными являются спонтанные опухоли. Далее, в порядке усиления иммуногенности, могут быть названы опухоли, индуцированные метилхолантеном, который вызывает кратковременное состояние иммуносупрессии, и опухоли, индуцированные ультрафиолетовым излучением — наиболее иммуногенные в этом ряду. Пересадка последних обычно возможна только у реципиентов с нарушенным клеточным иммунитетом, например мышей линии nude, лишенных тимуса и Т-клеток, тогда как у нормальных реципиентов такие опухоли не растут. Особенностью экспериментальной системы, использующей ультрафиолетовое излучение в качестве канцерогенного фактора, является стойкая и длительная системная супрессия иммунного ответа, связанная с подавлением костимуляторной функции дендритных клеток кожи — клеток Лангерганса [26, 27]. На фоне подавления клеточного иммунитета вполне вероятно возникновение иммуногенных вариантов опухолей, подавить рост которых нарушенная иммунная система не может. Таким образом, иммуногенность опухолей может быть тесно связана с эффективностью иммунологического надзора, в зависимости от которой в организме может происходить селекция тех или иных вариантов опухолевых клеток. Эта концепция подтверждается тем, что опухоли, индуцированные метилхолантеном у мышей, подверженных ультрафиолетовому излучению, часто являются более иммуногенными, чем опухоли, индуцированные метилхолантеном у нормальных животных [28]. Поскольку трансплантации опухолевых клеток человеку невозможны, были предприняты попытки создать экспериментальные системы с использованием животных, в которых было бы можно поддерживать линии опухолевых клеток человека и тестировать ответы на них. В качестве реципиентов для создания таких систем чаще всего используют мышей, несущих мутации beige и nude, лишенных NK- и Т-клеток, либо мышей линии SCID, лишенных Т- и В-клеток. Иммунная система таких животных неспособна распознать трансплантационные антигены клеток человека, поэтому трансплантации как опухолевых, так и иммунокомпетентных клеток человека, отвечающих на опухолевые клетки, проходят успешно. Такие мыши с трансплантированными иммунокомпетентными клетками человека получили название humanized mice [29].

В последние годы широко используются также трансгенные экспериментальные животные и нокаут-животные по иммунологически значимым генам. Трансгенные Т-клеточные рецепторы (T-cell receptor, TCR) позволяют получить значительное количество клеток с заранее известной специфичностью и, соответственно, значительно более выраженный иммунный ответ животных к отдельным комбинациям молекула МНС-пептид, чем животных дикого типа. Перевод таких трансгенных животных на генетическую основу нока-

утов по генам рекомбиназ, осуществляющих реаранжировку Т- и В-клеточных рецепторов (и поэтому лишенных Т- и В-клеток), позволяет получить трансгенных животных с Т-клетками, экспрессирующими только 1 тип антигенспецифического TCR без примеси Т-клеток, экспрессирующих эндогенные рецепторы [30]. Мыши, экспрессирующие трансгенный зеленый флуоресцентный белок, могут быть с успехом использованы при изучении процессов метастазирования опухолевых клеток и механизмов дифференцировки предшественников иммунокомпетентных клеток и клеток памяти при адоптивном переносе нетрансгенным реципиентам [31]. Интерес в последнее время представляет использование в исследованиях трансгенных моделей с тканеспецифической и стадиоспецифической экспрессией антигенов. Следует ожидать, что в скором времени эти модели будут привлечены к исследованию процессов внутритимусной селекции Т-лимфоцитов, специфичных к опухолеассоциированным антигенам. Использование нокаутов по иммунологически значимым генам значительно расширяет аналитические возможности исследователя в изучении механизмов индукции противоопухолевого ответа. В частности, применение нокаутов по генам β_2 -микроглобулина и транспортеров, ассоциированных с процессингом антигенов, позволяет выявить роль эндогенного процессинга и презентации антигена в организме реципиента и понять, распознается ли он непосредственно на опухолевой клетке, или для возникновения иммунного ответа на него необходима кросс-презентация дендритными клетками [32]. Использование нокаутов по генам *CD4* и *CD8* позволяет оценить роль кооперации таких типов клеток в иммунном ответе на конкретный антиген и определить его зависимость от соответствующей субпопуляции Т-лимфоцитов [33].

В последние годы предприняты попытки генетической модификации опухолевых клеток, нацеленной на усиление их иммуногенности трансфекцией генов цитокинов и костимулирующих лигандов профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК). Наиболее часто для этого используются аденовирусные векторы, позволяющие получить транзитную экспрессию трансгенного белка в опухолевых клетках. В последние годы широкое распространение получают методы трансфекции, основанные на использовании ретровирусных и лентивирусных векторов, позволяющие с высокой эффективностью получать стабильные трансфектанты с фиксированным количеством копий трансгена на геном [34, 35].

Несмотря на то, что метод обнаружения опухолеспецифического иммунитета по отторжению трансплантированных линий опухолевых клеток был разработан в середине прошлого века, он до сих пор остается основным средством оценки эффективности противоопухолевого иммунитета в эксперименте. В той или иной модификации он, как правило, присутствует в экспериментальных работах, нацеленных

на разработку противоопухолевых терапевтических вакцин, изменение антигенных свойств опухолевых клеток, усиление их иммуногенности трансфекциями генов цитокинов и костимуляторных лигандов, иммунизацию пептидами и т. д.

Во взаимодействии иммунной системы с сингенными опухолевыми клетками, совпадающими с реципиентом по МНС, обычно удается разглядеть 3 фазы: элиминацию, равновесие и ускользание опухолевых клеток от иммунного ответа [36, 37]. В процессе элиминации иммунная система распознает опухолевые клетки и активно устраняет их из организма, но интенсивность ответа оказывается недостаточной для того, чтобы довести этот процесс до конца. В фазе равновесия удается наблюдать опухолевые клетки, неограниченный рост которых все еще контролируется иммунной системой. В ходе давления, оказываемого иммунной системой на опухолевые клетки, последние претерпевают отбор, приводящий к накоплению клеток, способных этому давлению противостоять. Наиболее часто встречающимися способами сделать это являются утрата опухолевыми клетками молекул МНС и продукция супрессорных факторов, таких как TGF β [38] и фермент индоламин-2,3-диоксигеназа. Этот фермент разрушает триптофан в сайтах контакта Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками, достаточное наличие которого во внеклеточной среде считается критически важным для успешной активации Т-лимфоцитов [39]. Появление таких опухолевых клеток характеризует 3-ю фазу взаимодействия — ускользание, — в ходе которого опухолевые клетки уходят из-под контроля иммунной системы и разрушают организм опухоленосителя. В иммунных ответах на трансплантированные аллогенные опухолевые клетки увидеть обычно удается лишь фазу элиминации, которая приводит к полному отторжению опухоли и излечению реципиента [40].

Молекулы главного комплекса гистосовместимости в распознавании трансплантационных и опухолевых антигенов

Одной из наиболее существенных проблем является вопрос о том, в каком виде Т-клетки распознают аллогенные молекулы МНС — в виде пептидов аллогенных молекул, процессированных и представленных клетками реципиента (непрямое аллогенное распознавание), или нативные молекулы аллоантигенов распознаются непосредственно на опухолевой клетке (прямое аллогенное распознавание). Очевидно, что привычная схема, в соответствии с которой дендритные клетки представляют Т-лимфоцитам пептиды белков патогена, в этом случае не годится, так как мишенью эффекторных Т-лимфоцитов становятся опухолевые клетки, экспрессирующие нативные аллогенные молекулы МНС, а не их пептиды в комплексе с молекулами МНС реципиента. Наши эксперименты показали, что ведущим механизмом распознавания аллоантигенов опухолей клетками CD8⁺ является прямое аллогенное распознавание [41, 42].

Этот результат противоречит устоявшейся догме, заключающейся в том, что только профессиональные АПК способны индуцировать первичный ответ Т-лимфоцитов. Действительно, для активации Т-клеток CD4⁺ необходима коэкспрессия антигенспецифического и костимулирующего лигандов на поверхности одной и той же АПК [43]. Природа этой зависимости состоит в необходимости формирования организованного иммунологического синапса между Т-лимфоцитом и АПК для успешной активации Т-лимфоцита CD4⁺ [44, 45]. Зависимость Т-клеток CD8⁺ от презентации антигена профессиональной АПК гораздо менее очевидна, поскольку активация наивных клеток CD8⁺ не требует образования организованного иммунологического синапса и формирования центрального супрамолекулярного активационного кластера [46, 47]. Эти факты допускают возможность существования 3-клеточной системы кооперации, в которой Т-клетка CD8⁺ распознает аллогенную молекулу МНС на поверхности непрофессиональной аллогенной АПК, а костимуляторный лиганд — на поверхности дендритной клетки, не участвующей в презентации. Такую модель предлагали неоднократно по мере накопления фактов, противоречащих догме «2 сигнала от 1 АПК», а механизм костимуляции, реализованный в ней, получил название транс-костимуляции [48, 49]. Данная модель могла бы объяснить, каким образом индуцируется ответ Т-клеток CD8⁺ на непрофессиональные аллогенные АПК, оставаясь зависимым от костимуляции, а также почему фибробласт, трансфицированный генами белков LCMV, становится эффективной АПК, когда попадает в лимфоидную ткань [50, 51].

Результаты наших исследований показали, что роль АПК реципиента в ответе на аллоантигены опухолевых клеток может быть пассивной и сводиться к предоставлению лишь спектра костимуляторных сигналов, необходимых Т-клеткам для пролиферации. Не исключено, что при первичном ответе на клетки аллогенной опухоли в роли таких АПК могут выступать другие типы клеток миелоидного происхождения, например нейтрофилы. Это предположение основано на том, что согласно нашим данным нейтрофилы являются единственным источником CD80 и IL-12, индуцируемым в ответе на клетки аллогенной опухоли. Поэтому они могут быть существенным фактором, определяющим преимущественное развитие иммунного ответа Т-лимфоцитов CD8⁺ в отсутствие индукторов врожденного иммунитета. Такая секвестрация могла бы «включаться» в результате первичного распознавания молекулы МНС класса I Т-лимфоцитом CD8⁺, приводить к массивной миграции нейтрофилов в селезенку и преимущественной индукции CTL и тем самым обуславливать высокую эффективность ответа на аллогенные опухолевые клетки [52, 53]. Это предположение не является столь невероятным, как может показаться на первый взгляд: трансдифференцировка нейтрофилов человека и приобретение ими функций

профессиональных АПК могут иметь место при инкубации с некоторыми цитокинами, а также в клинике при системных инфекциях и хронических воспалительных заболеваниях [54]. Неоднократно показано, что нейтрофилы принимают участие в противоопухолевом адаптивном иммунном ответе, способствуя его поляризации по первому типу [55]. Способность нейтрофилов усиливать ответы Т-клеток в реакциях на трансплантат отмечалась и другими авторами [56].

Альтернативное объяснение тому, как непрофессиональные аллогенные опухолевые АПК вызывают иммунный ответ у реципиента, появилось недавно: было показано, что сформированные МНС/пептидные комплексы могут переноситься на поверхность дендритной клетки в ходе контакта с другими типами клеток. Этот процесс в литературе получил название кросс-дрессинга [57]. В качестве возможных механизмов такого переноса рассматривают трофоцитоз, продукцию экзосом и образование межклеточных микротоннелей [58].

В 1997 г. было установлено, что способность TCR к взаимодействию с молекулами МНС не формируется в процессе тимусной селекции, как полагали ранее, а присутствует в репертуаре исходно [59]. Врожденная способность к распознаванию Т-клетками молекул МНС поставила вопрос о том, каковы ее структурные основы. Подробное исследование вариативности первичной структуры молекул МНС класса I млекопитающих стало информативным для углубленного понимания их функций. Синтетические пептиды, соответствующие вариативным участкам доменов α_1 и α_2 молекулы K^b, при внутривенном введении интактным и иммунным экспериментальным животным вызывают появление в их селезенке клеток, способных к специфической супрессии иммунного ответа. Оказалось, что не все эпитопы молекулы МНС способны вызвать супрессию иммунного ответа — из 6 использованных нами пептидов биологически активными были 3 (AA62-83, AA149-160, AA163-174), соответствующие последовательности С-концевых участков α -спиралей доменов α_1 и α_2 молекулы K^b [60]. Было обнаружено, что выявленные супрессорные пептиды полностью совпадают с участками молекулы МНС, контактирующими с рецепторами CTL [61]. Возможность функциональной трансформации CTL в Т-супрессоры при различных условиях их культивирования показывает, что выявленный эффект не связан с особой эпитопной специфичностью Т-супрессоров [62]. Интересен тот факт, что пептиды С-концевых участков α -спиралей подавляют ответы на молекулы МНС класса II и даже приводят к некоторому продлению периода жизни аллогенных кожных трансплантатов. Иммунологическая специфичность этого эффекта указывает на то, что он может быть обусловлен взаимодействием пептидов с антигенспецифическими рецепторами Т-клеток. С учетом способности линейных пептидов α -спиралей молекул МНС образовывать в растворе α -спиральные

структуры [63] можно предположить, что они способны к прямому консервативному взаимодействию с рецепторами Т-клеток, имитируя участки контактного взаимодействия молекул МНС с TCR. По всей видимости, эти консервативные взаимодействия являются отражением природы взаимодействия TCR с МНС, понимание которого существенно изменилось в последние годы.

На уровне распознаваемого лиганда способность различать аллельные формы молекул МНС может быть обусловлена ограниченностью разнообразия аминокислотных замен в тяжелых цепях, возникающей вследствие того, что ведущим механизмом формирования аллельного разнообразия молекул МНС являются генные конверсии с консервативными нетранскрибируемыми областями МНС [64, 65]. На уровне TCR распознавание такого ограниченного разнообразия и независимость от процессов внутритимусной селекции могут определяться только герминальными последовательностями генных сегментов TCR, не проходящими реаранжировку в процессе селекции. В структурном отношении эти последовательности могут быть отнесены к CDR2 α и CDR2 β , определяющим комплементарность взаимодействия TCR с С-концевыми участками α -спиралей первых 2 доменов молекул МНС класса I [66].

В некоторых зарубежных лабораториях было установлено, что ответ антигенспецифических CTL может наблюдаться при использовании аллогенных мишеней из мышей, нокаутированных по генам β_2 -микроглобулина и молекул-транспортёров TAP, и вследствие этого не имеющих на поверхности полноценных комплексов «молекула МНС/ β_2 -микроглобулин/пептид», а экспрессирующих лишь незначительное количество тяжелых цепей молекул МНС класса I [67, 68]. Это обстоятельство указывает на относительную независимость взаимодействия TCR аллоспецифических CTL от изменений в конформации молекул МНС класса I, определяемых связанным с ними пептидом, и на важную роль структуры тяжелых цепей молекул МНС в таком взаимодействии. Иными словами, утрата пептида в антигенсвязывающей щели молекулы МНС не приводит к исчезновению антигенных свойств молекул МНС класса I и способности к взаимодействию с TCR. Исследования термодинамики взаимодействия TCR с молекулами МНС показали «подвижность» контактных сайтов молекул МНС, взаимодействующих с TCR [69]. Таким образом, возможность имитации отдельных эпитопов молекул МНС синтетическими пептидами представляется реальной.

Поскольку иммуногенность антигена существенно зависит от аффинности его связывания с рецепторами иммунокомпетентных клеток, в последующих исследованиях мы попытались модифицировать ее путем создания синтетических древовидных пептидов с последовательностями сайтов контакта молекул МНС с TCR. Мы обнаружили, что древовидный тетрамер

пептида AA158-175, соответствующий области контакта α_2 -домена молекулы МНС с TCR, способен к эффективному примированию экспериментальных животных, экспрессирующих молекулы МНС класса I, содержащие идентичную последовательность аминокислотных остатков. Этот факт указывает на то, что стимулирующие свойства конструкции обусловлены ее мультиплетной структурой, а не способностью презентироваться в контексте МНС реципиента. Исследование спектра цитокинов и костимуляторных лигандов, которые экспрессируются линиями Т-лимфоцитов, индуцированными тетрамером *in vitro*, показало, что они экспрессируют мРНК CTLA-4, FasL, TNF α , TGF β и IL-4. Однократная иммунизация тетрамером приводит к существенному увеличению доли клеток CD4 $^{+}$ в периферических лимфоидных органах реципиентов, а также к стимуляции иммунного ответа Т-клеток на молекулы МНС, в том числе слабо иммуногенные (молекула Н-2D b) и даже сингенные. Это свойство тетрамерных конструкций позволило нам получить эффект увеличения продолжительности жизни у мышей линии bm1, получивших летальную дозу клеток лимфомы EL4 [70].

Поскольку анализ реальных процессов внутритимусной дифференцировки *in vivo* затруднен возможным вкладом миграции клеток, биологическую активность синтезированных препаратов оценивали в органных культурах фетального тимуса *in vitro*. Этот метод был использован также для оценки сиквенсной специфичности древовидного тетрамера пептида AA158-175 молекулы Н-2D b . Для этого биологическую активность исходного тетрамера сравнивали с активностью тетрамера с инвертированной последовательностью аминокислотных остатков («антисенса»). Обнаружено, что оба синтезированных пептида влияют на дифференцировку Т-клеток в органных культурах тимуса сходным образом, но «антисенс» вызывает сопоставимый эффект в концентрации, в 50 раз превышающей концентрацию исходного препарата. Таким образом, биологическая активность тетрамера AA158-175 молекулы Н-2D b обусловлена наличием в его структуре определенной последовательности аминокислот. В культуре *in vitro* присутствие тетрамера приводит к снижению доли клеток CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ и увеличению CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$. Этот эффект сопровождается заметным увеличением количества клеток CD3 $^{-}$ в популяции CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$, что свидетельствует об активации Т-клеток CD4 $^{+}$ через комплекс TCR/CD3 и делеции части клонов Т-клеток, подобной делеции, вызываемой суперантигенами. Напротив, аллогенный тетрамер молекулы Н-2K k , добавленный в органные культуры эмбрионального тимуса, стимулирует образование однопозитивных Т-клеток, экспрессирующих CD3, что может рассматриваться как позитивная селекция.

Необычная специфичность Т-клеток CD4 $^{+}$ к пептидам молекул МНС класса I требовала разумного объяснения. В связи с этим мы предприняли попытку

определить, может ли разнообразие аллельных форм молекул МНС класса I млекопитающих быть описано в виде единой «формулы», содержащей информацию о мотивах в их первичной структуре. Данная попытка может быть успешной в отношении молекул МНС класса I плацентарных млекопитающих. В структуре доменов, играющих важную роль в распознавании рецепторами Т-клеток, удалось обнаружить позиции аминокислотных остатков, которые неизменны даже у видов, весьма отдаленных друг от друга в эволюционном отношении.

Идентификация единого мотива в первичной структуре молекул МНС класса I млекопитающих и спектра возможных аминокислотных замен их вариабельных остатков позволила увидеть сходство в структуре классических молекул МНС классов I и II. Она обнаружила короткий фрагмент, локализованный в районе аномальной укладки α -спирали в α_2 -домене молекул МНС класса I (AA154-164) и в β -цепях молекул МНС класса II (AA63-73 в A_β -цепях и AA69-79 в E_β -цепях), спектр возможных аминокислотных замен в котором почти полностью совпадает у молекул обоих классов. По всей видимости, этот фрагмент может играть роль «якоря» для взаимодействия с TCR. Именно в этом фрагменте находятся аминокислотные замены у мутанта bm12 — единственного известного мутанта по молекуле МНС класса II A_β^b , способного вызвать сильную аллогенную реакцию у реципиентов дикого типа, а также измененные аминокислотные остатки мутанта bm1, реакция на который приводит к пролиферации клонов, не проявляющих кросс-реактивности с какими-либо другими мутантами серии bm. По всей видимости, модификация этого фрагмента приводит к практически полной «смене образа» аллогенной молекулы и, соответственно, его распознаванию перекрывающейся частью репертуара Т-клеток [71].

Как отмечалось выше, в норме Т-клетки $CD4^+$ распознают молекулы МНС класса II, а $CD8^+$ — класса I. Эта особенность определяется специфичностью корцепторов, взаимодействующих с консервативными регионами молекул МНС. Таким образом, справедливость гипотезы о значимости структурного сходства молекул обоих классов можно было бы проверить в независимой экспериментальной системе, в которой корцептор Т-клетки был бы изменен. Для проверки данной гипотезы мы получили Т-гибридомы из клеток $CD8^+$, пролиферирующих в ответе на клетки мутанта bm3, и опухолевого партнера с экспрессией трансгенного корцептора $CD4$, который позволил бы выявить TCR, реагирующие с молекулами МНС класса II. Из 396 проанализированных гибридом 37 оказались реактивными в ответе на стимуляторы, экспрессирующие молекулу МНС класса II доноров клеток $CD8^+$. В целом это согласуется с частотой встречаемости клонов, перекрестно реагирующих на аллельные продукты МНС, что позволяет сделать заключение о существовании Т-клеточных клонов с рецепторами, облада-

ющими двойной специфичностью к молекулам МНС I и II классов [72].

Роль Т-клеточного репертуара и его рецепторов в противоопухолевом иммунном ответе

При развитии Т-лимфоциты подвергаются процессам позитивной и негативной селекции, имеющим целью создание клонального репертуара, способного распознать и элиминировать «чужое» и вместе с тем неспособного распознать и разрушить «свое». Нарушение процессов внутритимусной селекции вследствие модификации или отсутствия естественных лигандов рецепторов Т-клеток — молекул МНС — приводит либо к развитию аутоиммунных патологий и разрушению организма, либо к иммунодефицитным состояниям, имеющим следствием неспособность организма контролировать инфекцию и рост трансформированных клонов.

Подавляющее большинство подходов к коррекции специфического противоопухолевого иммунитета ставит целью стимуляцию иммунного ответа на антигены опухолевых клеток. Как правило, этой цели пытаются достичь усилением или замещением костимуляторных функций клеток иммунной системы, например, при терапии цитокинами и векторами, усиливающими экспрессию цитокинов и костимуляторных лигандов, при терапии дендритными клетками, а также при экстракорпоральной стимуляции Т-лимфоцитов онкологических больных цитокинами. Очевидно, что такая стратегия может привести к успеху при стимуляции ответа на уникальные опухолеспецифические антигены. Вместе с тем, назначая курс иммунотерапии конкретному больному и не имея, как правило, информации о природе мутаций, приведших к злокачественной трансформации, и о спектре молекул HLA пациента, определяющем потенциальную эффективность такого лечения, врач вынужден действовать вслепую. Большие возможности для диагностики и иммунотерапии онкологических заболеваний представляет группа опухолеассоциированных антигенов — нормальных немутантных белков, которые экспрессируются в трансформированных клетках, но редко встречаются или слабо экспрессируются в нормальных клетках организма. Главная проблема в стимуляции иммунного ответа на такие антигены состоит именно в том, что они представляют собой нормальные белки организма, толерантность к которым развивается в процессе внутритимусной селекции, отбирающей клоны с низкоаффинными рецепторами к «своему» [73, 74]. Вместе с тем в медулярном эпителии тимуса имеет место экспрессия широкого спектра сугубо тканеспецифических белков, включая антигены группы testis, контролируемые геном *Aire* [75–77]. По этой причине попытки стимуляции иммунного ответа на опухолеассоциированные антигены, а также попытки получения на их основе противоопухолевых вакцин, не учитывающие

необходимости параллельного воздействия на процессы внутритимусной селекции, обречены лишь на ограниченный успех.

Теоретически существуют 2 способа решить эту проблему. Первый заключается в том, чтобы использовать в ответе организма А на опухолеассоциированные антигены Т-клетки, сформировавшиеся в репертуаре организма Б, экспрессирующего иной спектр молекул МНС. В этом случае в организме Б могут существовать Т-клеточные клоны с рецепторами, способными к высокоаффинному взаимодействию с пептидами опухолеассоциированных антигенов, представленными в виде комплексов с молекулами МНС на клетках организма А, поскольку Т-клеточный репертуар организма Б не подвергался негативной селекции комплексами пептидов таких антигенов с молекулами МНС организма А. В литературе представлены успешные результаты, полученные группой Стаусса, при использовании такого подхода в иммунотерапии опухолей, экспрессирующих антиген Вильмса [78]. Однако широкое применение этого метода в клинике ограничено высокой стоимостью предварительных исследовательских работ, необходимых для лечения конкретного больного, и значительного времени, затраченного для корректного подбора донора и получения антигенспецифических клонов. Тем не менее эта технология уже работает и применяется в клинике [79, 80].

Второй способ заключается в коррекции репертуара антигенспецифических клонов в тимусе. Несмотря на кажущуюся очевидность, этот подход практически не разрабатывается иммунологами. Причиной тому является ограниченность подходов к изучению внутритимусной селекции и ее влияния на периферический пул Т-лимфоцитов. Как правило, существующие модели представляют собой искусственно выведенных животных, экспрессирующих трансгенные TCR, а также трансгенные молекулы МНС с ковалентно связанными пептидами. С использованием таких моделей удастся проследить судьбу Т-клеток, экспрессирующих определенный тип TCR в присутствии или в отсутствие специфического трансгенного лиганда. Однако из-за высокой технической сложности клонирования TCR и создания экспрессирующих систем *in vivo* количество клонированных TCR и экспериментальных моделей, основанных на их использовании, невелико.

Оригинальные трансгенные модели противоопухолевого и трансплантационного иммунитета

Одним из путей направленного воздействия на репертуар Т-лимфоцитов мог бы стать трансгенез индивидуальных цепей TCR на уровне зиготы. Функциональные последствия такого трансгенеза различны в связи с тем, что экспрессия α - и β -цепей в разной степени подчинена правилам аллельного исключения. Экспрессия α -цепей ими не контролируется и поэтому приводит к расширению репертуара TCR. Экспрессия

β -цепей строго подчинена правилам аллельного исключения, в связи с чем экспрессия трансгена β -цепи приводит к образованию репертуара рецепторов, в подавляющем большинстве которых присутствует трансгенная β -цепь, сужающая разнообразие репертуара. Накопленный нами в этом направлении опыт позволяет сделать первые обобщения.

Существующие модели с трансгенным TCR α/β имеют ряд недостатков, которые становятся серьезным препятствием для использования в исследованиях гомеостаза Т-лимфоцитов. К таким недостаткам относят глубокие нарушения характера дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе и нефизиологически высокое содержание Т-лимфоцитов с одинаковой специфичностью, что вынуждает исследователей применять инвазивные методы и схемы экспериментов, в частности адоптивные переносы трансгенных Т-клеток лимфопеничным животным дикого типа. Это побудило нас создать собственную трансгенную модель, в которой трансген кодирует одну из цепей TCR клеток памяти, допуская нормальную реарранжировку другой цепи и формирование разнообразного репертуара Т-лимфоцитов.

Ранее мы нашли эффективный способ вызывать селективный ответ клеток памяти, специфичных к аллогенным молекулам МНС класса I без сопутствующей активации и вовлечения в ответ клонов наивных Т-лимфоцитов [81]. Для этого мы использовали смешанную культуру лимфоцитов животных, предварительно иммунизированных клетками аллогенных опухолей, в качестве отвечающих Т-лимфоцитов и аллогенные спленоциты, убитые острым тепловым шоком (+45 °C, 1 ч), в качестве стимулирующих клеток. Мы показали, что в такой экспериментальной системе избирательно пролиферируют Т-клетки памяти CD8, специфичные к аллогенной молекуле МНС класса I и способные распознавать ее мутантные формы [65, 82]. Этот простой метод позволил получить клоны и Т-клеточные гибридомы клеток памяти, что, в свою очередь, дало возможность молекулярной идентификации и клонирования их рецепторов [83]. Следующим шагом стало получение животных с трансгенной экспрессией отдельных цепей TCR [84]. В силу полного или частичного (функционального) аллельного исключения α - и β -цепей TCR репертуар Т-клеток у таких животных оказывается в различной степени суженным, что позволяет исследовать влияние индивидуальных цепей TCR на проявление широкого ряда феноменов иммунитета, таких как внутритимусная селекция Т-лимфоцитов, их выживание на периферии, аллогенное распознавание, аутоиммунитет и формирование Т-клеток памяти.

Мы изучали последствия экспрессии трансгенов α - и β -цепей TCR Т-гибридомы клеток памяти, клонированных нами ранее. При исследовании тимусов трансгенных мышей мы не обнаружили нарушений в развитии Т-клеток, вызванных экспрессией трансгена. После прохождения внутритимусной селекции

лимфоциты CD4⁺ и CD8⁺, экспрессирующие трансген, выходят на периферию, успешно там рециркулируют, и их нормальное соотношение не нарушается.

Одной из основных задач нашего исследования была оценка взаимосвязи структуры TCR с фенотипическими особенностями Т-лимфоцитов, так как неясно, в какой мере они определяются структурой TCR. Важно было выяснить, влияет ли экспрессия трансгенной β-цепи TCR клеток памяти на поверхностный активационный фенотип Т-клеток. При цитофлуориметрическом анализе субпопуляции наивных Т-клеток, эффекторов и Т-клеток памяти мыши обычно идентифицируют на основе экспрессии маркеров CD44 и CD62L. При этом фенотип CD44⁺CD62L⁺ характеризует наивные Т-клетки, CD44⁺CD62L⁻ — клетки памяти, а CD44⁺CD62L⁻ — эффекторы. Цитофлуориметрический анализ экспрессии этих маркеров Т-клетками селезенки созданных нами мышей трансгенной линии показал выраженное снижение доли Т-клеток с фенотипом активированных клеток и увеличение доли клеток с фенотипом наивных Т-лимфоцитов. Таким образом, мы установили, что баланс субпопуляций наивных и активированных Т-клеток может меняться под воздействием экспрессии трансгена β-цепи TCR. Интересным открытием стало то, что Т-лимфоциты трансгенных животных, экспрессирующие эндогенные цепи TCR, приобретают фенотип активированных Т-клеток, что обычно имеет место в условиях лимфопении, вызванной облучением или воздействием цитостатиков [85].

В нашем исследовании неожиданным оказалось то, что клетки, экспрессирующие трансген β-цепи TCR клеток памяти, вопреки нашим ожиданиям не приобретают поверхностный фенотип CD44⁺, а утрачивают его, тогда как Т-клетки, экспрессирующие эндогенные β-цепи, его приобретают аналогично Т-лимфоцитам, находящимся в условиях лимфопении. Механизмы, лежащие в основе этого феномена, пока неясны, но могут быть связаны с конкуренцией Т-лимфоцитов за эндогенные комплексы пептид-МНС в лимфоидной ткани. В любом случае, очевидно, что полученные результаты свидетельствуют о наличии тесной взаимосвязи между особенностями структуры TCR и поверхностным активационным фенотипом отдельных Т-клеток. Такая перестройка репертуара у трансгенов по β-цепям TCR оказывается фатальной для успешного распознавания аллогенных молекул гистосовместимости — у обеих полученных нами трансгенных линий животных присутствовали дефекты в распознавании молекул гистосовместимости аллогенных опухолей. По всей видимости, причиной этого служит аллельное исключение, правилам которого подчинена экспрессия β-цепей TCR. У полученных нами мышей линии 1D1bFM на генетической основе линии R101 можно наблюдать все 3 фазы взаимодействия опухоли с иммунной системой хозяина — элиминацию, равновесие и ускользание, тогда как у мышей дикого типа можно

наблюдать только фазу элиминации. Наши результаты свидетельствуют о том, что принципиальных различий между трансплантационным и противоопухолевым ответами не существует. По всей видимости, мы получили новую перспективную биологическую модель, пригодную для изучения биологии противоопухолевого иммунного ответа и способов его модуляции [86].

Напротив, экспрессия α-цепей не подвержена аллельному исключению, и один Т-лимфоцит способен экспрессировать два TCR, если реаранжировка α-локусов на обеих хромосомах будет продуктивной. Тем не менее и в этом случае одна из α-цепей может проигрывать в конкуренции за объединение с β-цепью и не обнаруживаться на поверхности Т-лимфоцита. Отсутствие трансгенной α-цепи клеток памяти на поверхности полученных нами трансгенных животных может быть отнесено именно к этому случаю. Однако в присутствии специфического антигена — молекулы H-2K^b — Т-лимфоциты с трансгенной цепью появляются в перитонеальной полости мышей, отвечающих на экспрессирующие ее клетки лимфомы. Более того, значительная часть таких Т-лимфоцитов, по всей видимости, ассоциирована с эпителиями и не рециркулирует. Ускоренное отторжение клеток лимфомы EL4 у таких животных свидетельствует о том, что трансгенная α-цепь способна изменить направление дифференцировки Т-лимфоцита и привести к формированию у него свойств, характерных для клеток памяти [87]. Это подтверждают наши данные о профиле поверхностных маркеров Т-клеток, мигрирующих в перитонеальную полость в ответ на введение клеток лимфомы EL4 (CD8^{lo}CD103⁺CD3^{int}CD69^{hi}), что совпадает с характеристиками открытой недавно субпопуляции резидентных клеток памяти [88]. Полученные нами результаты свидетельствуют также о возможности существования клеток памяти до контакта организма с антигеном, так как достаточным условием появления резидентных клеток памяти, способных немедленно вступить в борьбу с условным патогеном, является трансгенная α-цепь TCR. Если это действительно так, то образование клеток памяти *in vivo* может быть объяснено эффектами клональной конкуренции и постепенного вытеснения клетками памяти других типов Т-лимфоцитов из иммунного ответа. В этом случае теоретическая основа, описывающая биологию клеток памяти и эффекты вакцинации, потребует существенного пересмотра. Не менее важным фактом считается то, что резидентные клетки памяти являются перспективным кандидатом на выполнение функции иммунологического надзора. В пользу этого говорит их тканевая локализация и способность немедленно вступить в борьбу с введенными животному опухолевыми клетками. Парадигма, господствующая сейчас в иммунологии, предполагает разделение функций врожденного (немедленного, но неспецифического) и адаптивного (специфического, но требующего времени для его раз-

вития) иммунитетов. В обнаруженной нами субпопуляции Т-лимфоцитов мы видим пример успешного объединения их качеств и способности к выполнению функций специфического иммунитета врожденно.

Отторжение аллогенных опухолей, отличающихся от организма реципиента молекулами МНС класса I, может служить моделью развития иммунного ответа на внутриклеточные микроорганизмы и вирусы. Всестороннее углубленное исследование полученной модели может открыть перспективы использования этого подхода в ветеринарии, а также, возможно, и генной терапии инфекционных заболеваний у человека. Не исключено, что подход окажется перспективным для создания врожденной устойчивости к фатальным быстроразвивающимся вирусным инфекциям у человека (например, вирусных геморрагических лихорадок). Помимо экспрессии трансгенной α -цепи такие искусственно созданные клетки памяти будут иметь нормальные разнообразные TCR и широкий спектр специфичностей, неотличимый от животных дикого типа. При этом ожидается, что трансгенная α -цепь будет создавать усиленный пул клеток, обладающих свойствами клеток памяти. Таким образом, не исключено, что трансгенез индивидуальных α -цепей приведет к формированию иммунологической защиты организма не только против антигена, к которому был специфичен исходный TCR, но и против широкого спектра посторонних патогенов.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что:

- функциональный потенциал клеток памяти может быть сформирован и реализован без первичной иммунизации реципиента;
- наличие в Т-лимфоците TCR с соответствующей структурой является достаточным условием возникновения потенциала клеток памяти;
- трансгенез α -цепей TCR может быть использован для создания врожденного специфического иммунитета к антигенам опухолевых клеток;
- вклад α - и β -цепей TCR в распознавание МНС/пептидных комплексов может быть независимым;
- особенности феноменологии специфических противоопухолевых иммунных ответов могут быть воспроизведены в ответах на трансплантационные антигены опухолевых клеток путем ограничения репертуара Т-лимфоцитов;
- Т-лимфоциты, обладающие свойствами резидентных клеток памяти, могут быть центральным клеточным элементом, осуществляющим иммунологический надзор;
- разница между трансплантационным и противоопухолевым иммунитетом не является абсолютной — феноменологические проявления и того и другого укладываются в континуум, определяемый разнообразием репертуара Т-лимфоцитов отвечающего организма.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. A Wiley-Interscience Publication. New York: John Wiley & Sons, 1986.
2. Jensen C.O. Experimentelle untersuchungen ber krebs bei mausen. Zentralbl Bakteriол Parasitol Infect 1903;34:28–34.
3. Loeb L. Tumor growth and tissue growth. Proc Amer Phil Soc 1908;47:1–12.
4. Tyzzer E.E. The study of inheritance in mice with reference to their susceptibility to transplanted tumors. J Med Res 1909;21:519–73.
5. Little C.C., Johnson B.W. The inheritance of susceptibility to implants of splenic tissue in mice. I. Japanese waltzing mice, albinos, and their F1 generation hybrids. Proc Soc Exp Biol Med 1922;19:163–7.
6. Gorer P.A. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. J Pathol Bacteriol 1937;44:691–7.
7. Gorer P.A., Mikulska Z.B. The antibody response to tumor inoculation. Improved methods of antibody detection. Cancer Res 1954;14:651–5.
8. Snell G.D. Methods for the study of histocompatibility antigens. J Genet 1948;49:87–108.
9. Snell G.D., Dosse J., Nathenson S. Histocompatibility. Academic Press. New York, 1976.
10. Klein J. List of congenic lines of mice. I. Lines with differences at alloantigen loci. Transplantation 1973;15:137–53.
11. Reif A.E., Allen J.M. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J Exp Med 1964;120:413–33.
12. Cantor H., Boyse E.A. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. J Exp Med 1975;141:1376–89.
13. Murphy K.P. Janeway's immunobiology. New York: Garland Science, 2012.
14. Brondz B.D. Interaction of immune lymphocytes with normal and neoplastic tissue cells. Folia Biol 1964;10:164–76.
15. Brondz B.D. Complex specificity of immune lymphocytes in allogeneic cell cultures. Folia Biol 1968;14:115–31.
16. Peck A.B., Wigzell H., Janeway C. Jr, Andersson L.C. Environmental and genetic control of T-cell activation *in vitro*: a study using isolated alloantigen-activated T-cell clones. Immunol Rev 1977;35:146–80.
17. Brondz B.D., Egorova S.G., Kotomina I.F. Enrichment of effector T lymphocytes specific to H-2 antigens by elution from allogeneic target cells and characterization of the eluted lymphocyte population. Eur J Immunol 1975;5(11):773–41.
18. Melief C.J., de Waal L.P., van der Meulen M.Y. et al. Fine specificity of alloimmune cytotoxic T lymphocytes directed against H-2K. A study with Kb mutants. J Exp Med 1980;151(5):993–1013.
19. Брондз Б.Д., Пименов А.А., Бландова З.К., Ворнакова Г.Н. Изучение природы перекрестной реактивности рецепторов цитотоксических Т-лимфоцитов, иммунных к антигенам комплекса H-2 с помощью их фракционирования на монослоях клеток-мишеней. Молекулярная биология 1982;(16):481–92. [Brondz B.D., Pimenov A.A., Blandova Z.K., Vornakova G.N. Studies of the nature of the cross-reactivity of receptors of cytotoxic T-lymphocytes,

- immune to antigens of H-2 complex by means of its fractioning at monolayers of target cells. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular biology* 1982;(16):481–92. (In Russ.).
20. Брондз Б.Д. Т-лимфоциты и их рецепторы в иммунологическом распознавании. М.: Наука, 1987. С. 353. [Bronz B.D. T-lymphocytes and its receptors in the recognition. Moscow: Nauka, 1987. P. 353 (In Russ.).]
21. Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 1943;3:326–33.
22. Prehn R.T., Main J.M. Immunity to methylcholantrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 1957;18:769–78.
23. Klein G., Sogren H.O., Klein E., Hellstrom K.E. Demonstration of resistance against methylcholantrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 1960;20:1561–72.
24. Kripke M.L. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:1333–6.
25. Vaage J. Nonvirus-associated antigens in virus-induced mammary tumors. *Cancer Res* 1968;28:2477–83.
26. Thorn R.M. Specific inhibition of cytotoxic memory cells produced against UV-induced tumors in UV-irradiated mice. *J Immunol* 1978;121(5):1920–6.
27. Denfeld R.W., Tesmann J.P., Dittmar H. et al. Further characterization of UVB radiation effects on Langerhans cells: altered expression of the costimulatory molecules B7–1 and B7–2. *Photochem Photobiol* 1998;67(5):554–60.
28. Roberts L.K., Daynes R.A. Modification of immunogenic properties of chemically induced tumors arising in hosts treated concomitantly with ultraviolet light. *J Immunol* 1980;125(1):438–47.
29. Verel I., Heider K.H., Siegmund M. et al. Tumor targeting properties of monoclonal antibodies with different affinity for target antigen CD44V6 in nude mice bearing head-and-neck cancer xenografts. *Int J Cancer* 2002;99(3):396–402.
30. Legrand N., Freitas A.A. CD8⁺ T lymphocytes in double alpha beta TCR transgenic mice. I. TCR expression and thymus selection in the absence or in the presence of self-antigen. *J Immunol* 2001;167(11):6150–7.
31. Ma X., Robin C., Ottersbach K., Dzierzak E. The Ly-6A(Sca-1) GFP Transgene is expressed in all adult mouse hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2002;20(6):514–21.
32. Johnsen A.K., France J., Nagy N. et al. Systemic deficits in transporter for antigen presentation (TAP) – 1 or proteasome subunit LMP2 have little or no effect on tumor incidence. *Int J Cancer* 2001;91(3):366–72.
33. Matechak E.O., Killeen N., Hedrick S.M., Fowlkes B.J. MHC class-II-specific T-cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity* 1996;4(4):337–47.
34. Quinonez R., Sutton R.E. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002;21(12):937–51.
35. Sumimoto H., Tsuji T., Miyoshi H. et al. Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells. *J Immunol Methods* 2002;271(1–2):153–65.
36. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoediting: from immuno-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3(11):991–8.
37. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Ann Rev Immunol* 2004;22:329–60.
38. Lin R.L., Zhao L.J. Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer. *Cancer Biol Med* 2015;12(4):385–93.
39. Munn D.H., Mellor A.L. IDO in the tumor microenvironment: inflammation, counter-regulation, and tolerance. *Trends Immunol* 2016;37(3):193–207.
40. Silaeva Y.Y., Grinenko T.S., Vagida M.S. et al. Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice. *J Immunotoxicol* 2014;11(4):393–9.
41. Zvezdova E.S., Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L. et al. Coreceptor function of CD4 in response to the MHC class I Molecule. *Mol Biol(Mosk)* 2008;42(4):662–72.
42. Kazansky D.B. MHC-restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol* 2008;5(4):369–84.
43. Janeway C.A. Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994;76(2):275–85.
44. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C. et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T-cell activation. *Science* 1999;285(5425):221–7.
45. Holdorf A.D., Lee K.H., Burack W.R. et al. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* 2002;3(3):259–64.
46. Goldstein J.S., Chen T., Gubina E. et al. ICAM-1 enhances MHC-peptide activation of CD8⁺ T-cells without an organized immunological synapse. *Eur J Immunol* 2000;30(11):3266–70.
47. O’Keefe J.P., Blaine K., Alegre M.L., Gajewski T.F. Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8⁺ T-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(25):9351–6.
48. Ding L., Shevach E.M. Activation of CD4⁺ T-cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* 1994;24(4):859–66.
49. Smythe J.A., Fink P.D., Logan G.J. et al. Human fibroblasts transduced with CD80 or CD86 efficiently trans-costimulate CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in HLA-restricted reactions: implications for immune augmentation cancer therapy and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163(6):3239–49.
50. Kundig T.M., Bachmann M.F., DiPaolo C. et al. Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 1995;268(5215):1343–7.
51. Ochsenbein A.F., Sierro S., Odermatt B. et al. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 2001;411(6841):1058–64.
52. Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Зvezdova E.S. и др. Накопление нейтрофилов в селезенке мышей, иммунизированных клетками аллогенных опухолей. Доклады академии наук 2005;402(3):421–6. [Pobezinskiy L.A., Pobezinskaya E.L., Zvezdova E.S. et al. Neutrophils’ accumulation in the spleen of mice, immunized with allogenic tumors’ cells. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences* 2005;402(3):421–6. (In Russ.).]
53. Марюхнич Е.В., Зvezdova E.S., Anfalova T.V. и др. Функциональная роль нейтрофилоподобных клеток селезенки в иммунном ответе на клетки аллогенных опухолей. Доклады академии наук 2007;414(1):126–9. [Maryukhnich E.V., Zvezdova E.S., Anfalova T.V. et al. Functional role of neutrophil-like cells of the spleen in the immune response to cells of allogenic tumors. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences* 2007;414(1):126–9. (In Russ.).]
54. Iking-Konert C., Cseko C., Wagner C. et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells. *J Mol Med* 2001;79(8):464–74.
55. Tanaka E., Sendo F. Abrogation of tumor-inhibitory MRC-OX8⁺(CD8⁺) effector T-cell generation in rats by selective depletion of neutrophils in vivo using a monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1993;54(1):131–6.
56. Buonocore S., Surquin M., Le Moine A., et al. Amplification of T-cell responses by neutrophils: relevance to allograft immunity. *Immunol Lett* 2004;94(3):163–6.
57. Wakim L.M., Bevan M.J. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8⁺ T-cell activation after viral infection. *Nature* 2011;471(7340):629–32.
58. Li L., Kim S., Herndon J.M. et al. Cross-dressed CD8 α ⁺/CD103⁺ dendritic cells prime CD8⁺ T-cells following vaccination. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2012;109(31):12716–21.
59. Zerrahn J., Held W., Raulet D.H. The MHC reactivity of the T-cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997;88(5):627–36.
60. Bronz B.D., Kazansky D.B., Chernysheva A.D., Ivanov V.S. Peptides of a major histocompatibility complex class I (Kb) molecule cause prolongation of skin graft survival and induce specific down-regulatory T-cells demonstrable in the mixed lymphocyte reaction. *Immunology* 1995;86(2):219–23.

61. Sun R., Shepherd S.E., Geier S.S. et al. Evidence that the antigen receptors of cytotoxic T lymphocytes interact with a common recognition pattern on the H-2K^b molecule. *Immunity* 1995;3(5):573–82.
62. Anfalova T.V., Galaktionov V.G., Brondz B.D. The functional transformation of cytotoxic lymphocytes into T-suppressors under the influence of two mediators. *Immunol Lett* 1997;59(2):121–6.
63. Constantine K.L., Mapelli C., Meyers C.A. et al. Micelle-bound conformational preferences of a peptide derived from a murine major histocompatibility complex class I molecule. *J Biol Chem* 1993;268(30):22830–7.
64. Nathenson S.G., Geliebter J., Pfaffenbach G.M., Zeff R.A. Murine major histocompatibility complex class-I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Annu Rev Immunol* 1986;4:471–502.
65. Kazanskii D.B., Chernysheva A.D., Sernova N.V. et al. The nature of epitopes, recognized by T-lymphocytes in the allogeneic immune response. *Mol Biol (Mosk)* 1998;32(4):692–702.
66. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z. et al. Ligand recognition by beta T-cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:523–44.
67. Van Kaer L., Ashton-Rickardt P.G., Pleogh H.L., Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD8⁺ T-cells. *Cell* 1993;71(7):1205–14.
68. Kuhns S.T., Tallquist M.D., Johnson A.J. et al. T-cell receptor interaction with class I heavy-chain influence T-cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;97(2):756–60.
69. Willcox B.E., Gao G.F., Wyer J.R. et al. TCR binding to peptide-MHC stabilizes a flexible recognition interface. *Immunity* 1999;10(3):357–65.
70. Казанский Д.Б., Силаева Ю.Ю., Анфалова Т.В. и др. Использование мультиплетных пептидов для стимуляции специфического клеточного иммунитета. *Аллергия, астма и клиническая иммунология* 2001;(1):48–51. [Kazanskiy D.B., Silaeva Yu.Yu., Anfalova T.V. et al. Use of multiplet peptides for the stimulation of the specific cell immunity. *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya* = *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2001;(1):48–51. (In Russ.)].
71. Казанский Д.Б., Побезинский Л.А., Терещенко Т.С. Мотивы в первичной структуре молекул МНС класса I и их использование для создания синтетических лигандов Т-клеточных рецепторов. *Вестник РАМН* 2004;(12):25–32. [Kazanskiy D.B., Pobezinskiy L.A., Tereshchenko T.S. Motives in the initial structure of MHC class I molecules and its use for the creation of synthetic ligands of T-cell receptors. *Vestnik RAMN* = *RAMS Herald* 2004;(12):25–32. (In Russ.)].
72. Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Терещенко Т.С. и др. Периферический пул Т-клеток CD8⁺ содержит лимфоциты с антигенспецифическими рецепторами, распознающими сингенные молекулы МНС класса II. *Онтогенез* 2004;35(3):183–9. [Pobezinskiy L.A., Pobezinskaya E.L., Tereshchenko T.S. et al. The peripheral pool of CD8⁺ T-cells contains lymphocytes with antigen specific receptors, recognizing syngeneic molecules of MHC class II. *Ontogenez* = *Ontogenesis* 2004;35(3):183–9. (In Russ.)].
73. Казанский Д.Б. Внутритимусная селекция и иммунотерапия рака. *Русский журнал СПИД, рак и общественное здоровье* 2007;11(1):25–32. [Kazanskiy D.B. Intrathymic selection and immune therapy of cancer. *Russkiy zhurnal SPID, rak i obshchestvennoe zdorov'e* = *Russian Journal for AIDS, Cancer and Public Health* 2007;11(1):25–32. (In Russ.)].
74. Kazansky D.B. Intrathymic selection: new insight into tumor immunology. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:133–44.
75. Derbinski J., Schulte A., Kyewski B., Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunol* 2001;2(11):1032–9.
76. Anderson M.S., Venzani E.S., Klein L. et al. Protection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;289(5597):1395–401.
77. Liston A., Lesage S., Wilson J. et al. Aire regulates negative selection of organ-specific T-cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):350–4.
78. Gao L., Bellantuono I., Elsasser A. et al. Selective elimination of leukemic CD34(+) progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood* 2000;95(7):2198–203.
79. Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015;348(6230):62–8.
80. Klebanoff C.A., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Prospects for gene-engineered T-cell immunotherapy for solid cancers. *Nat Med* 2016;22(1):26–36.
81. Казанский Д.Б., Петришев В.Н., Штиль А.А. и др. Использование теплового шока антигенпрезентирующих клеток для функционального тестирования аллоспецифических Т-клеток памяти. *Биоорганическая химия* 1999;(25):117–28. [Kazanskiy D.B., Petrishchev V.N., Shtil' A.A. et al. Use of the thermal shock of antigen presenting cells for the functional testing of allospecific memory T-cells. *Bioorganicheskaya khimiya* = *Bioorganic Chemistry* 1999;(25):117–28. (In Russ.)].
82. Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А. и др. Подавление клетками памяти CD8⁺ первичного аллогенного ответа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2005;(140):556–61. [Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L., Pobezinskiy L.A. et al. Suppression of the initial allogeneic response by CD8⁺ memory cells. *Byullyuten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of the Experimental Biology and Medicine* 2005;(140):556–61. (In Russ.)].
83. Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю. и др. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клона клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2004;(137):563–8. [Pobezinskaya E.L., Pobezinskiy L.A., Silaeva Yu.Yu. et al. Cross-reactivity of the T-cell receptor of the clone of CD8⁺ memory cells, received in the response of for the immunization by allogeneic tumor cells. *Byullyuten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of the Experimental Biology and Medicine* 2004;(137):563–8. (In Russ.)].
84. Звездова Е.С., Силаева Ю.Ю., Вагида М.С. и др. Создание трансгенных животных, экспрессирующих α- и β-цепи аутореактивного TCR. *Молекулярная биология* 2010;(44):311–22. [Zvezdova E.S., Silaeva Yu.Yu., Vagida M.S. et al. Creation of transgenic animals, expressing α- and β-chains of the autoreactive TCR. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology* 2010;(44):311–22. (In Russ.)].
85. Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С. и др. Сокращение пула Т-лимфоцитов с поверхностным фенотипом эффекторов и клеток памяти под воздействием экспрессии трансгена β-цепи Т-клеточного рецептора. *Биохимия* 2013;78(5):714–26. [Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A., Vagida M.S. et al. Reduction of the pool of T-lymphocytes with the surface phenotype of effectors and memory cells, influenced by the expression of transgene of the β-chain of the T-cell receptor. *Biokhimiya* = *Biochemistry* 2013;78(5):714–26. (In Russ.)].
86. Silaeva Y.Y., Grinenko T.S., Vagida M.S. et al. Immune selection of tumor cells in TCR β-chain transgenic mice. *J Immunotoxicol* 2014;11(4):393–9.
87. Казанский Д.Б. Трансгенные технологии создания иммунологической защиты организма. Сборник докладов семинара Фонда перспективных исследований «Проблемные вопросы иммунологии» 03 октября 2014 г., М.: Б-принт, 2015. С. 17–25. [Kazanskiy D.B. Transgene technologies of the creation of the immunologic protection of the organism. Volume of reports of the workshop of the Prospective Research Foundation "Problematic Immunology Issues" October 03 2014, Moscow: B-print, 2015. Pp. 17–25. (In Russ.)].
88. Mackay L.K., Rahimpour A., Ma J.Z. et al. The developmental pathway for CD103(+) CD8⁺ tissue-resident memory T-cells of skin. *Nat Immunol* 2013;14(12):1294–301.

Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования

В.В. Татарский

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15

Контакты: Виктор Вячеславович Татарский tatarskii@gmail.com

Wnt — один из важнейших сигнальных путей в клетке, необходимый для нормального эмбрионального развития, дифференцировки, поддержания фенотипа стволовых клеток, определения полярности клетки и миграции. Мутации в этом каскаде ассоциированы с опухолевым ростом (особенно с раком толстой кишки, лейкозами и гепатокарциномами), участвуют в поддержании опухолеиницирующих клеток и метастазировании. В последнее время проводят исследования ингибиторов сигнального пути Wnt в качестве противоопухолевых препаратов. Однако эти ингибиторы находятся только в ранних фазах клинических испытаний. В обзоре рассматриваются основные мишени таких противоопухолевых ингибиторов и их текущий статус в предклинических и клинических исследованиях.

Ключевые слова: Wnt, β -катенин, опухолеиницирующие клетки, метастазирование

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-28-31

The Wnt signaling pathway: prospects for pharmacological regulation

V.V. Tatarskiy

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
Build. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Wnt cascade is one of the most important signal pathways in the cell, which is required for normal embryonic development, differentiation, maintenance of stem cell phenotype and migration. Mutations in this pathway are associated with tumor growth (especially with colon cancers, hepatocarcinomas and leukemias), where they participate in maintenance of tumor-initiating cells and metastasing. Because of that there is a considerable interest to develop inhibitors of Wnt pathway as anti-tumor agent. But this inhibitors are still only in early stages of clinical investigations. In this article we review the main targets for this anti-cancer agents and their preclinical and clinical status.

Key words: Wnt, β -catenin, tumor-initiating cells, metastasis

Введение

Wnt является одним из важнейших сигнальных путей в клетке, необходимым для нормального эмбрионального развития, дифференцировки, поддержания фенотипа стволовых клеток, определения полярности клетки и миграции. Мутации в этом каскаде связаны с опухолями (особенно с раком толстой кишки, гепатокарциномами и лейкозией), диабетом 2-го типа и нейродегенеративными заболеваниями. Особый интерес представляет роль Wnt в поддержании опухолеиницирующих клеток и метастазировании. В связи с этим в последнее время ведется обширный поиск ингибиторов сигнального пути Wnt в качестве противоопухолевых препаратов, однако до сих пор эти ингибиторы находятся только в ранних фазах клинических испытаний. В настоящем обзоре рассматриваются основные мишени таких противоопухолевых ингибиторов и их текущий статус в предклинических и клинических исследованиях.

Сигнальный путь Wnt

В литературе выделяют 3 сигнальных пути в составе Wnt: канонический Wnt-каскад, контролирующий связывание β -катенина с транскрипционными факторами TCF/LEF, неканонический кальциевый каскад, в котором не участвует β -катенин, и каскад, контролирующий полярность клетки. Из 3 каскадов канонический наиболее хорошо изучен, особенно в контексте канцерогенеза.

У человека семейство Wnt-белков состоит из 19 белков, которые связываются с 15 рецепторами Фрицзлед (Frizzled, Fzd) или корецепторами LRP [1]. Wnt-лиганды являются гликопротеинами, для секреции которых необходимо добавление пальмитата к цистеиновым [2] и сериновым остаткам в эндоплазматическом ретикулуле (последняя реакция осуществляется белком поркупин (porcupine) [3]. Связывание Wnt-лиганда с Fzd приводит к рекрутированию белка дишевелл (disheveled, Dvl), который ингибирует фосфо-

рилирование β -катенина деградирующим комплексом (GSK3 β , аксин-1 и APC). Фосфорилирование β -катенина деградирующим комплексом по серинам 33, 37 и треонину 41 вызывает его протеосомную деградацию; после ингибирования деградирующего комплекса Dvl количество β -катенина быстро увеличивается, после чего он транслоцируется в ядро. В ядре β -катенин связывается с транскрипционными факторами семейств TCF и LEF, вызывая транскрипцию своих зависимых генов, важнейшими из которых являются *c-Мус*, *циклин D*, *сурвивин*, *MMP7*, *MDR1* и *CD44* [4–6]. Наиболее важной для терапии является роль сигнального пути Wnt в поддержании фенотипа опухоленицирующих клеток и эпителиально-мезенхимального перехода, необходимых для метастазирования опухоли. Подавление экспрессии или делеции β -катенина ингибирует образование опухоленицирующих клеток в модели хронического миелолейкоза с экспрессией Bcr-Abl, острой миелоцитарной лейкемии [7] и опухолях молочной железы [8].

Активирующие мутации сигнального пути Wnt широко распространены в ряде опухолей. Это мутации компонентов деградирующего комплекса (APC, аксин), самого β -катенина, белков TCF (например, TCF7L2) и Wtx. Помимо мутаций нарушения передачи сигнала в каскаде происходят через изменения экспрессии ряда белков из-за эпигенетических трансформаций. По данным базы данных COSMIC, мутации APC наиболее характерны для опухолей толстой кишки, желудка, поджелудочной железы; β -катенина — для опухолей печени, мягких тканей, эндометрия, поджелудочной железы; аксин-1 — для опухолей печени и желчных протоков, Wtx — для опухолей почек и толстой кишки и TCF7L2 — для опухолей толстой кишки [9].

Ингибиторы Wnt

Предклинические исследования показали, что ингибирование сигнального пути Wnt приводит к терапевтическому эффекту в ряде Wnt-зависимых опухолей. Разработка противоопухолевых соединений сосредоточена на ингибировании 4 частей каскада: пальмитировании Wnt-лигандов белком поркупин (ингибировании секреции), связывании Wnt-лигандов со своими рецепторами и корецепторами, предотвращении деактивации деградирующего комплекса и/или транслокации β -катенина в ядро и связывании β -катенина с другими компонентами транскрипционного комплекса. В настоящее время в базе данных ClinicalTrials.gov имеются ссылки на 42 клинических испытания, связанные с ингибированием сигнального пути Wnt.

Ингибирование синтеза Wnt — наиболее распространенная стратегия снижения активности Wnt-каскада. Главным достоинством ингибирования активности Wnt на этом уровне является низкая токсичность. В то время как остальные мишени в сигнальном пути Wnt зачастую связаны с другими сигнальными путями, поркупин специфично ингибирует секрецию Wnt с не-

большими побочными эффектами [10]. В настоящее время проводятся или планируются клинические испытания ингибитора поркупин Wnt974 у пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы и раком толстой кишки с BRAF-мутациями и активирующими мутациями, приводящими к повышенному синтезу Wnt-лиганда (мутации RNF43 или RSPO) (NCT01351103), с раком толстой кишки с BRAF-мутациями в комбинации с BRAF-ингибитором LGX818 и EGFR-ингибитором цетуксимабом (NCT02278133), с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (NCT02649530). Другой ингибитор поркупин — ETC-159 — находится в I фазе клинических испытаний против солидных опухолей (NCT02521844) [11]. Недостатками такого подхода являются невозможность терапии опухолей с мутациями, которые происходят ниже по каскаду, и неизбирательность ингибирования Wnt-лигандов (поркупин ингибирует секрецию всех Wnt-лигандов, однако не все из них имеют проонкогенные свойства).

Более специфичной стратегией считается ингибирование рецепторов и корецепторов Wnt. Такой подход позволяет подавить активность только тех Wnt-лигандов, которые способствуют росту опухоли, не затрагивая другие. Применяются как ингибиторы рецепторов и корецепторов, так и рецепторы-ловушки, связывающие Wnt-лиганды. Антитело OMP-18R5 связывается с 5 из 10 Fzd-рецепторов (Fzd1, Fzd2, Fzd5, Fzd7 и Fzd8), каждый из которых регулирует канонический Wnt-сигналинг. В предклинических испытаниях OMP-18R5 ингибировал рост ксенографтов, полученных из опухолей толстой кишки (без мутаций APC или β -катенина), поджелудочной железы, рака легкого и рака молочной железы, как при отдельном введении, так и в комбинации со стандартными химиотерапевтическими препаратами, такими как таксол, иринотекан, гемцитабин. Также OMP-18R5 значительно снижает туморогенность и частоту ремиссии опухолей на моделях животных, что позволяет рассчитывать на его эффективность против опухоленицирующих клеток [12]. В настоящее время проводятся или планируются 4 клинических исследования с OMP-18R5: I фазы против солидных опухолей (NCT01345201), I фазы в комбинации с паклитаксолом против метастатического рака молочной железы (NCT01973309), в комбинации с паклитаксолом и гемцитабином против рака поджелудочной железы (NCT02005315) и в комбинации с доцетаксолом против мелкоклеточного рака легкого (NCT01957007).

Также в стадии клинических испытаний находится рецептор-ловушка OMP-54F28 — участок Fzd8, конъюгированного с Fc-фрагментом иммуноглобулина G 1-го класса (IgG1). OMP-54F28 значительно снижает рост ксенографтов как при монотерапии, так и в комбинации с гемцитабином, а также уменьшает способность опухоли к метастазированию, туморогенность опухолей у мышей линий NOD и SCID и количество клеток, экспрессирующих CD44 [13]. По предварительным результатам I фазы клиниче-

ских испытаний препарат хорошо переносится в терапевтических концентрациях (NCT01608867) основные побочные эффекты связаны с ремоделированием костной ткани [14]. В настоящее время проводятся 3 других клинических испытания этого препарата в фазе Ib: в комбинации с сорафенибом против метастатической гепатокарциномы (NCT02069145), с гемцитабином и паклитакселом против рака поджелудочной железы (NCT02050178) и с паклитакселом и карбоплатином против рака яичника (NCT02092363).

Альтернативным подходом является использование нетоксичного антитела к Fzd10 — OTSA101. Само антитело слабо токсично, однако его конъюгат, меченный иттрием (^{90}Y), обладает выраженным противоопухолевым эффектом в ксенографтной модели. В настоящее время проводится I фаза клинических испытаний на синовиальной саркоме (NCT01469975).

Ряд ингибиторов предотвращает взаимодействие Dvl с рецепторами Fzd: ингибиторы взаимодействия Pzd домена Dvl с Fzd — NSC668036 [15], 3289-8625 [16] — ингибируют этот сигнальный путь и замедляют рост опухолевых клеток в культуре. Однако их селективная активность против специфичных Wnt-зависимых опухолей не показана, также как активность на моделях животных. Ни одно из таких соединений клинически не испытывают.

Ряд малых молекул направлен против деградирующего комплекса. Большой класс потенциальных противоопухолевых агентов стабилизирует аксин-1 через ингибирование ферментов танкиразы, которые стимулируют его протеосомную деградацию. Ингибирование танкиразы приводит к стабилизации деградирующего комплекса и деградации β -катенина даже при мутациях APC. Ряд этих молекул, такие как XAV-939, JW-55 и IWR, хорошо изучены в опухолевых и предклинических моделях, они вызывают остановку пролиферации β -катенинзависимых опухолей [17, 18]. Несмотря на это, ни один ингибитор танкиразы не находится в клинических испытаниях. Причинами этого, скорее всего, являются низкий терапевтический индекс и высокая токсичность для желудочно-кишечного тракта, приводящие к нарушению пролиферации столбовых клеток кишечника, воспалению и даже некрозу [19]. Одобренный антигельминтный препарат пирвиний памоат подавляет активность Wnt через активацию SK1, который, в свою очередь, активирует деградирующий комплекс и обладает противоопухолевой активностью против β -катенинзависимых клеточных линий [20], однако в клинических испытаниях у пациентов с опухолевыми новообразованиями он не проверялся. Противомаларийный препарат артезунат также предотвращает транслокацию β -катенина в ядро, замедляет рост β -катенинзависимых ксенографтов и метастазирование [21]. В настоящее время проводится II фаза его клинических испытаний в рамках неoadъювантной терапии опухолей толстой кишки (NCT02633098).

Инактивация экспрессии генов белков-ингибиторов сигнального пути Wnt распространена в различных опухолях и приводит к активации каскада. Использование демитилирующих агентов позволяет реактивировать промоторы таких генов и подавить активность сигнального пути Wnt в клетках [22]. В настоящее время проводится клиническое испытание демитилирования промоторов ряда таких генов (*APCDD1*, *AXIN2*, *DKK1*, *LGR5* и *ASCL2*) при действии демитилирующего агента децитабина (NCT01882660).

Взаимодействие β -катенина с партнерами в транскрипционном комплексе также считается мишенью для противоопухолевой терапии. Известно несколько классов молекул, которые предотвращают связывание β -катенина с TCF7L2 и одновременно подавляют рост β -катенинзависимых линий и ксенографтов, однако многие из этих молекул не обладают достаточной селективностью, и ни одну из них не испытывали клинически. Наиболее хорошо изученным является ингибирование взаимодействия кофактора транскрипции CREB-связывающего белка с β -катенином с помощью малой молекулы PRI-724 (и ее предшественника ICG-001) [23]. Этот белок — один из кофакторов транскрипции, и его взаимодействие с β -катенином необходимо для поддержания фенотипа опухолеиницирующих клеток [24], в то время как ингибирование этого взаимодействия приводит к дифференцировке таких клеток. Это соединение исследовали в 3 клинических испытаниях I фазы: против рака поджелудочной железы в комбинации с гемцитабином (NCT01764477) и против острой и хронической миелоидной лейкемии (NCT01606579). В исследовании I фазы на 18 пациентах была показана безопасность высоких доз препарата; зафиксировано прекращение роста опухоли у 3 пациентов и снижение экспрессии Wnt-зависимого гена *сурвивина* (NCT01302405) [25]. Планируют исследование PRI-724 во II фазе клинических испытаний против рака толстой кишки в комбинациях с бевацизумабом, 5-фторурацилом, оксалиплатином и лейковорином кальция (NCT02413853).

Отдельным подходом является модулирование неканонической части каскада Wnt или сигнальных путей, пересекающихся с каноническим каскадом. Так, анализ опухолевых линий с высокой активностью Wnt-каскада показал, что они зависят от комплекса β -катенина с транскрипционным фактором TBX5 и транскрипционным регулятором YAP1 и что дазатиниб, ингибитор киназы YES1, необходимой для функционирования этого комплекса, предотвращает пролиферацию β -катенинзависимых линий [26]. Неканонические части сигнального пути Wnt зачастую связаны с противоопухолевыми эффектами, например, активатор неканонического каскада Foxo5 — пептидный аналог Wnt5a — предотвращает метастазирование [27]; в настоящее время его исследуют в I фазе клинических испытаний против метастатических карцином молочной железы, толстой кишки и простаты (NCT02020291).

Заключение

В последние 5 лет значительно ускорилось изучение роли сигнального пути Wnt в канцерогенезе, проводятся клинические испытания первых терапевтических соединений — ингибиторов Wnt. Однако внедрение этих агентов в клиническую практику зачастую ограничено высокой токсичностью препаратов для нормальных тканей и недостаточностью собственно ингиби-

рования Wnt для торможения роста опухолей. Очевидно, что требуются как исследования новых мишеней в этом сигнальном пути, так и подбор оптимальных комбинаций с имеющимися противоопухолевыми агентами. Результаты проводящихся в настоящее время клинических испытаний позволят определить перспективность фармакологической регуляции Wnt-каскада для противоопухолевой терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- MacDonald B.T., He X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(12):a007880.
- Willert K., Brown J.D., Danenberg E. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423(6938):448–52.
- Takada R., Satomi Y., Kurata T. et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 2006;11(6):791–801.
- He T.C., Sparks A.B., Rago C. et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281(5382):1509–12.
- Tetsu O., McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398(6726):422–6.
- Ashida K., Terada T., Kitamura Y. et al. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study. *Hepatology* 1998;27(4):974–82.
- Hu Y., Li S. Survival regulation of leukemia stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(5):1039–50.
- Moumen M., Chiche A., Decraene C. et al. Myc is required for β -catenin-mediated mammary stem cell amplification and tumorigenesis. *Mol Cancer* 2013;12(1):132.
- Anastas J.N., Moon R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13(1):11–26.
- Liu J., Pan S., Hsieh M.H. et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(50):20224–9.
- Madan B., Ke Z., Harmston N. et al. Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene* 2015.
- Gurney A., Axelrod F., Bond C.J. et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(29):11717–22.
- Le P.N., McDermott J. D., Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther* 2015;146:1–11.
- Smith D.C., Gordon M., Messersmith W. et al. A first-in-human Phase I study of anti-cancer stem cell (CSC) agent OMP-54F28 (FZD8-Fc) targeting the WNT pathway in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2013;12(11 Suppl):B79.
- Shan J., Shi D.-L., Wang J. et al. Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain. *Biochemistry* 2005;44(47):15495–503.
- Grandy D., Shan J., Zhang X. et al. Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *J Biol Chem* 2009;284(24):16256–63.
- Huang S.M., Mishina Y.M., Liu S., et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 2009;461(7264):614–20.
- Waler J., Machon O., Tumova L. et al. A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res* 2012;72(11):2822–32.
- Zhong Y., Katavolos P., Nguyen T. et al. Tankyrase inhibition causes reversible intestinal toxicity in mice with a therapeutic index < 1. *Toxicol Pathol* 2015;44(2):267–78.
- Thorne C.A., Hanson A.J., Schneider J. et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 α . *Nat Chem Biol* 2010;6(11):829–36.
- Li L.N., Zhang H.D., Yuan S.J. et al. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/beta-catenin pathway. *Int J Cancer* 2007;121(6):1360–5.
- Li K., Hu C., Mei C. et al. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. *J Transl Med* 2014;12:167.
- Emami K.H., Nguyen C., Ma H. et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(34):12682–7.
- Lenz H.J., Kahn M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci* 2014;105(9):1087–92.
- El-Khoueiry A.B. A phase I first-in-human study of PRI-724 in patients(pts) with advanced solid tumors. In *J Clin Oncol* 2013.
- Rosenbluh J., Nijhawan D., Cox A.G. et al. β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 2012;151(7):1457–73.
- Säthholm A., Tuomela J., Rosenkvist J. et al. The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxo-5 inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility. *Clin Cancer Res* 2008;14(20):6556–63.

Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы

А.М. Строганова, А.И. Карселадзе

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Михайловна Строганова stroganova_am@mail.ru

Нейробластома — наиболее распространенная экстракраниальная опухоль у детей, происходит из развивающихся нейрональных клеток симпатической нервной системы (стволовых клеток нервного гребня) и имеет разнообразные биологические и клинические характеристики. Средний возраст дебюта заболевания — 18 мес. Нейробластома отличается рядом уникальных черт: способность к спонтанной регрессии у детей младше 12 мес даже с отдаленными метастазами, к дифференцировке (созревание в ганглионеврому) у детей после первого года жизни и к стремительному агрессивному развитию и бурному метастазированию. Существуют 2 клинические классификации нейробластомы: Международная система стадирования нейробластом (International Neuroblastoma Staging System), которая основывается на результатах оперативного вмешательства, и классификация предоперационного стадирования (International Neuroblastoma Risk Group Staging System). Одной из принципиально важных проблем для клинической картины нейробластомы является сложность прогнозирования. Наряду с параметрами клинического характера (возраст пациента, распространение и локализация опухоли) многообещающими оказались некоторые гистологические, молекулярно-биохимические (плоидность) и генетические (хромосомные aberrации, статус гена MYCN, делеция локусов 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча хромосомы 17 и др.) характеристики опухолевых клеток. Амплификация гена MYCN наблюдается в 20–30 % первичных нейробластом и является одним из главных показателей агрессивности заболевания, ранней устойчивости к химиотерапии и неблагоприятного прогноза. Существует 2 типа амплификации гена MYCN: экстрахромосомная (наличие двойных ацентричных хромосом) и внутрехромосомная (гомогенно окрашенные регионы). При изучении двойных ацентричных хромосом был отмечен интересный факт: они могут быть элиминированы (удалены) из ядра путем формирования микроядер. Амплификация онкогена MYCN часто сопровождается делецией локуса 1p36 и увеличением плеча 17q, реже — делецией 11q23, что является факторами неблагоприятного прогноза заболевания. В статье подробно рассматриваются специфические черты биологического поведения нейробластомы, не свойственные другим опухолям; гистологическое строение; факторы, определяющие прогноз заболевания, в том числе статус гена MYCN; механизмы формирования амплификации и элиминации амплифицированных последовательностей из ядра.

Ключевые слова: нейробластома, история изучения, гистологическая структура, классификация, амплификация гена MYCN, гетерогенность амплификации, прогностические факторы, элиминация амплифицированных последовательностей, хромосомные aberrации

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-32-43

Neuroblastoma: morphological pattern, molecular genetic features, and prognostic factors

A.M. Stroganova, A.I. Karseladze

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

Neuroblastoma, the most common extracranial tumor of childhood, arises from the developing neurons of the sympathetic nervous system (neural crest stem cells) and has various biological and clinical characteristics. The mean age at disease onset is 18 months. Neuroblastoma has a number of unique characteristics: a capacity for spontaneous regression in babies younger than 12 months even in the presence of distant metastases, for differentiation (maturation into ganglioneuroma) in infants after the first year of life, and for swift aggressive development and rapid metastasis. There are 2 clinical classifications of neuroblastoma: the International neuroblastoma staging system that is based on surgical results and the International Neuroblastoma Risk Group Staging System. One of the fundamentally important problems for the clinical picture of neuroblastoma is difficulties making its prognosis. Along with clinical parameters (a patient's age, tumor extent and site), some histological, molecular biochemical (ploidy) and genetic (chromosomal aberrations, MYCN gene status, deletion of the locus 1p36 and 11q, the longer arm of chromosome 17, etc.) characteristics of tumor cells are of considerable promise. MYCN gene amplification is observed in 20–30 % of primary neuroblastomas and it is one of the major indicators of disease aggressiveness, early chemotherapy resistance, and a poor prognosis. There are 2 types of MYCN gene amplification: extrachromosomal (double acentric chromosomes) and intrachromosomal (homogeneously painted regions). Examination of double acentric chromosomes revealed an interesting fact that it may be eliminated (removed) from the nucleus through the formation of micronuclei. MYCN oncogene amplification is accompanied frequently by 1p36 locus deletion and longer 17q arm and less frequently by 11q23 deletion; these are poor prognostic factors for the disease. The paper considers in detail the specific, unique characteristics of the biological behavior of neuroblastoma, which are untypical of other tumors; his-

tological structure; determinants of the prognosis of the disease, including MYCN gene status; and mechanisms for formation of the amplification and elimination of amplified sequences from the nucleus.

Key words: neuroblastoma, history of study, histological pattern, classification, MYCN gene amplification, amplification heterogeneity, prognostic factors, amplification of sequences, chromosomal aberrations

История изучения нейробластом

Нейробластома (более точный, но менее используемый термин «периферическая нейробластная опухоль») — наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста, происходит из развивающихся нейрональных клеток симпатической нервной системы (стволовых клеток нервного гребня).

Опухоль была впервые описана в 1864 г. немецким ученым Rudolf Ludwig Karl Virchow, который назвал ее «детской глиомой». В 1891 г. немецкий патолог Felix Marchand отметил, что опухоль развивается из симпатической нервной системы и надпочечников. Стадию IVS нейробластомы, которая характеризуется метастазированием в печень, но не в кости, описал William Perre в 1901 г. Название «нейробластома» было предложено James Homer Wright. Он в 1910 г. показал, что ряд опухолей забрюшинного пространства и заднего средостения имеет четкое морфологическое сходство с незрелой примитивной нервной тканью. J. Wright также документировал формирование в образцах костного мозга округлых структур из клеток, которые получили название псевдорозеток Homer-Wright.

В 1914 г. Karl Herxheimer применил серебряные красители, позволяющие визуализировать нейрональные фибриллы под микроскопом.

В 1927 г. H. Cushing и S. Wolbach заметили, что не все нейробластомы злокачественные, хотя многие из них широко метастазируют в печень, кожу, кости, костный мозг; другие исчезают вне зависимости от лечения. Авторы продемонстрировали, что в редких случаях опухоли становятся доброкачественными ганглионевромами, которые могут исчезать сами по себе [1]. В 1966 г. в своей монографии T. Everson и W. Cole добавили к этому, что трансформация злокачественной формы опухоли в доброкачественную было замечено у детей старше 6 мес [2].

Общая характеристика нейробластом

Наиболее часто нейробластомы диагностируют у детей, их доля составляет 7–10 % всех опухолей детского возраста, включая лейкозы. Средний возраст дебюта заболевания — 18 месяцев, при этом нейробластому у 50 % пациентов диагностируют в возрасте 2 лет и у 90 % — до 6 лет.

В целях доклинического выявления нейробластомы в ряде стран (в Японии и Канаде более 35 лет назад и позднее в европейских странах) был введен массовый скрининг. Полученные результаты вызвали разногласия, так как скрининг в возрасте от нескольких

недель до 6 месяцев привел к существенному увеличению количества диагностируемых нейробластом с благоприятным прогнозом, но не привел к уменьшению опухолей с агрессивной IV стадией и снижению общей смертности. Это указывает на то, что генетически и биологически «благоприятные» опухоли особенно в возрасте до 6 месяцев клинически не обнаруживаются, но способны к спонтанной регрессии позднее [3–6]. Было рекомендовано прекращение скрининга у детей младше 7 месяцев. Скрининг в возрасте 9–12 месяцев, проводимый в Японии и Австрии, возможно, выявляет генетически неблагоприятные и гетерогенные опухоли.

Большинство нейробластом возникают спорадически. Семейные (наследственные) случаи описывают редко. Однако в работе американских и итальянских исследователей показано, что причиной возникновения большинства случаев наследственных нейробластом служат активирующие мутации в тирозинкиназном домене онкогена *ALK* (anaplastic lymphoma kinase). Соматические мутации, приводящие к активации этого онкогена, наблюдаются в 5–15 % нейробластом. Дети со спорадической или наследственной нейробластомой в сочетании с синдромом центральной гиповентиляции («проклятие Ундины») и/или болезнью Гиршпрунга обычно имеют мутации в области гена *RHOX2B* — гомеодомена фактора транскрипции, экспрессирующегося в клетках, формирующих ганглии. Хотя большинство семейных случаев нейробластом ассоциированы с нарушением в генах *ALK* и *RHOX2B*, скорее всего, будут найдены дополнительные гены, отвечающие за развитие нейробластомы. Возможно, вероятность возникновения нейробластомы увеличена у пациентов с нейрофиброматозом I типа, ассоциированного с нарушениями в генах *RHOX2B* и *NF1/2*. Возникновение опухоли под воздействием условий окружающей среды неизвестно [5, 7–9].

Анатомическая локализация нейробластом достаточно разнообразна: 50 % в надпочечниках, в пара- и превертебральных симпатических ганглиях и паранганглиях (5 % в цервикальных, 15 % в торакальных, 25 % в ретроперитонеальных и 5 % в тазовых). Нейробластома с локализацией первичного очага в надпочечнике статистически имеет более низкую безрецидивную выживаемость по сравнению с опухолями других локализаций [10].

Нейробластома принадлежит к группе эмбриональных опухолей, таких как гепатобластома, нефробластома, эмбриональная рабдомиосаркома. Все они характеризуются манифестацией в раннем возрасте,

имеют сходные цитоморфологические характеристики, свойственные эмбриональным опухолям. Эмбриональное происхождение нейробластомы установлено методом иммуногистохимии (ИГХ) с помощью таких белковых маркеров, как Phox2b и C-kit (маркеры стволовых клеток нервного гребня), Sox10 и AP2α (эмбриональные глиальные маркеры, которые экспрессируются в незрелых глиальных клетках нейробластных опухолей) [11].

Нейробластому отличает ряд специфических, уникальных черт ее биологического поведения, не свойственных другим злокачественным опухолям.

- Спонтанная регрессия опухоли (без цитотоксического лечения) у некоторых детей младше 12 месяцев [2, 5, 12, 13].
- Способность к дифференцировке (созревание в ганглионеврому) у детей после первого года жизни. Это удивительное свойство опухолевых клеток нейробластомы впервые описано Харви Кушингом в 1926 г. у пациента (1 год 8 месяцев) с низкодифференцированной нейробластомой, у которого спустя 9 лет остаточная опухоль дифференцировалась в ганглионеврому [1]. Также в литературе есть сообщение о том, что вероятность созревания опухоли зависела от пола и была выше у девочек, чем у мальчиков [14]. Процесс созревания также зарегистрирован при исследовании культуры клеток, взятых из агрессивно растущей опухоли. В процессе культивирования клетки приобретали черты дифференцирующейся нервной ткани. Различные агенты способны индуцировать этот процесс *in vitro* (ретиноевая кислота (фактор роста нервной ткани), некоторые цитостатики, папаверин) [12].
- Способность к стремительному агрессивному развитию и бурному метастазированию. У 60 % пациентов опухоли метастазируют в костный мозг, кости, лимфатические узлы, печень и кожу. Уникальный пример распространенных метастазов с благоприятным прогнозом — это стадия нейробластомы IVS [15–17, 18].

Клинические стадии нейробластомы

По Международной системе стадирования нейробластом (International neuroblastoma staging system, INSS, 1986) различают 4 клинические стадии. Данная система основывается на результатах оперативного вмешательства.

Стадия I. Локализованная опухоль, находящаяся в области первоначального развития; новообразование полностью удалено с микроскопическими признаками его остатков или без них; макроскопически — подтвержденное отсутствие поражения лимфатических узлов по обе стороны позвоночника.

Стадия IIa. Односторонняя опухоль с удалением большей ее части; микроскопически — нет поражения лимфатических узлов с обеих сторон.

Стадия IIb. Односторонняя опухоль, удаленная полностью или большая ее часть; микроскопически — имеется поражение односторонних лимфатических узлов.

Стадия III. Опухоль распространяется на противоположную сторону с метастатическим поражением регионарных лимфатических узлов или без него; односторонняя опухоль с метастазами в противоположных лимфатических узлах; срединная опухоль с метастазами в лимфатических узлах с обеих сторон.

Стадия IV. Диссеминированная опухоль с метастазами в отдаленные лимфатические узлы, кости скелета, печень и поражением костного мозга.

Стадия IVS. Локализованная первичная опухоль I, IIa и IIb стадий, имеющая метастазы в печень, кожу и/или костный мозг.

В 2009 г. была введена новая клиническая классификация нейробластом (классификация предоперационного стадирования) — International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) [19].

Стадия L1. Локализованные опухоли, не затрагивающие жизненно важных структур, ограниченные в пределах одного отдела — шея, грудь, живот или таз.

Стадия L2. Локорегиональные опухоли с вовлечением 1 или нескольких радиологических факторов риска (по данным компьютерной томографии или магнитно-резонансной томографии): шея, шейно-грудной переход, грудная клетка, торакоабдоминальная область, брюшная полость/таз, распространение в спинномозговой канал, инфильтрация окружающих органов/структур.

Стадия M. Отдаленное метастазирование (исключая стадию MS).

Стадия MS. Метастатическая болезнь у пациентов младше 18 месяцев с метастазами в кожу, печень и/или костный мозг.

В классификации INRGSS, в отличие от INSS, локорегиональное поражение протекает 2 стадии вместо 3, так как возрастает важность биологических прогностических факторов, и отмечена хорошая общая выживаемость у пациентов с неметастатической нейробластомой. Система предоперационного стадирования INRGSS может быть использована в качестве самостоятельной и независимой классификации для определения группы риска и дальнейшей тактики лечения, однако она не предназначена для замены классификации INSS. Предполагается, что обе системы будут использоваться параллельно [19].

Гистологическое строение нейробластом

Микроструктура нейробластомы сложна и отражает процесс созревания опухоли. Существующие гистологические классификации морфологического строения нейробластом (INPC-Shimada, Joshi) основаны на степени дифференцировки опухоли: от недифференцированной мелкокруглоклеточной нейробластомы до высокодифференцированной ганглионевромы.

Клеточный состав нейробластомы:

1) нейробласты:

- мелкие клетки с круглыми ядрами, в которых хроматин распределен в виде мелких точек («соль и перец»), тонкий ободок эозинофильной цитоплазмы; хорошо видны границы между клетками;
- крупные клетки с ядрами в 1,5–2,0 раза больше типичных ядер нейробластов, с 1–4 видимыми ядрышками. Обычно встречаются в недифференцированных и низкодифференцированных нейробластомах (8–10 %). Ассоциированы с *MYCN*-амплификацией и плохим прогнозом;

2) ганглиозные клетки, имеющие крупные круглые ядра с видимыми ядрышками, широкую эозинофильную цитоплазму с тельцами Ниссля (базофильные гранулы, располагающиеся на эндоплазматической сети).

Строма, окружающая клетки нейробластомы, также отражает уровень дифференцировки:

1) шванновская строма — для идентификации методом ИГХ применяются антитела к S100 (позитивное окрашивание);

2) нейропил — фибриллярные экстрацеллюлярные волокна;

3) плотный лимфоидный инфильтрат (присутствует нечасто).

В Международной гистологической классификации нейробластомы (INPC-Shimada system) выделяют 4 категории по степени клеточной дифференцировки [20]:

1) нейробластома (бедная шванновской стромой):

- недифференцированная, полностью состоящая из нейробластов. Отсутствуют зрелые ганглиозные клетки (часто требуется ИГХ-исследование для верификации диагноза). Характеризуется бедной шванновской стромой (менее 50 % окружающей стромы или может отсутствовать) (рис. 1а);
- низкодифференцированная, преимущественно состоящая из нейробластов. Имеется менее 5 % созревающих или зрелых ганглиозных клеток; по крайней мере 1 фокус нейропила. Характеризуется бедной шванновской стромой (менее 50 % окружающей стромы или может отсутствовать) (рис. 1б);
- дифференцированная, преимущественно состоящая из нейробластов. Имеется более 5 % созревающих или зрелых ганглиозных клеток; по крайней мере 1 фокус нейропила. Характеризуется бедной шванновской стромой (менее 50 % окружающей стромы или может отсутствовать);

2) нодулярная ганглионейробластома, преимущественно состоящая из созревающих или зрелых ганглиозных клеток. Имеется по крайней мере 1 ограниченный участок (узел) остаточных нейробластов. Нодулярная ганглионейробластома и все последующие типы (ганглионейробластома и ганглионеврома) богаты шванновской стромой (50 % и более окружающей стромы);

3) ганглионейробластома, преимущественно состоящая из созревающих или зрелых ганглиозных кле-

ток. Имеется ≥ 1 участка остаточных нейробластов, смешанных с ганглиозными клетками (изолированные участки нейробластов отсутствуют) (рис. 1в);

4) ганглионеврома:

- созревающая, полностью состоящая из созревающих или зрелых ганглиозных клеток. Отсутствуют остаточные нейробласты;
- зрелая, полностью состоящая из зрелых ганглиозных клеток. Отсутствуют остаточные нейробласты (рис. 1г).

В типичных случаях опухоль состоит из мелких однородных круглых клеток с гиперхромным ядром, окруженным тонким ободком цитоплазмы. Для нейробластомы характерно формирование псевдорозеток Homer-Wright — своеобразных морфологических структур, образованных по периферии ядрами нейробластов с расположенными по центру эозинофильными фибриллами. Опухоль часто содержит большие участки некроза. Интерстициальные кровоизлияния относительно часто встречаются в менее дифференцированных опухолях, диффузная инфильтрация лимфоцитами — в более дифференцированных. Наличие кальцификатов — характерный признак нейробластомы, их количество может увеличиваться в процессе ответа опухоли на терапию. Сообщается также, что присутствие видимых ядрышек в клетках нейробластомы является признаком амплификации гена *MYCN*. Предполагается, что это результат наличия большого количества транскриптов этого гена [21].

Для точной верификации диагноза практически всегда необходимо проведение ИГХ-исследования. Клеточные компоненты нейробластомы могут быть идентифицированы с помощью ряда белковых маркеров: S100, S100A6 (Calcyclin) (семейство кальцийсвязывающих белков для идентификации глиального компонента), нейрофиламенты (NF), хромогранин, синаптофизин, нейронспецифическая энолаза (NSE) [11].

Факторы, определяющие прогноз заболевания

Одной из принципиально важных проблем нейробластомы является сложность прогнозирования. Наряду с параметрами клинического характера (возраст пациента [22], распространение и локализация опухоли [7, 23]) многообещающими оказались гистологические (гистопатологическая классификация по системе Н. Shimada [20], количество клеток с митозом [24] и апоптозом), молекулярно-биохимические (ploidy [25, 26]) и генетические (хромосомные aberrации, статус гена *MYCN*, делеция локусов 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча хромосомы 17 и др.) характеристики опухолевых клеток [17, 27–29].

К факторам благоприятного прогноза относят: возраст пациента младше 1 года, стадии I, II или IVS, отсутствие амплификации гена *MYCN* и сегментных хромосомных aberrаций, полисомия (увеличение количества целой хромосомы).

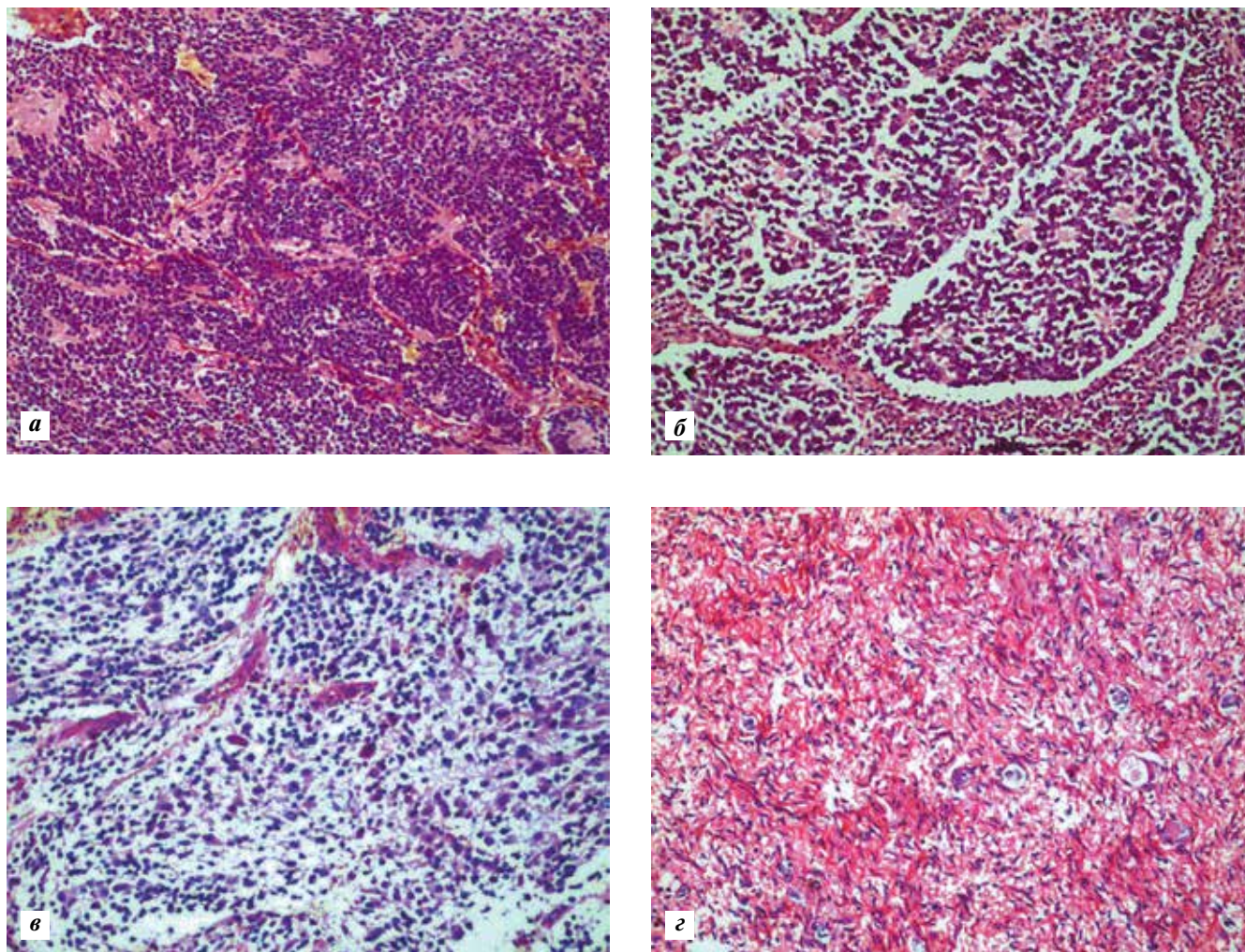


Рис. 1. Гистологическое строение нейробластомы (окраска гематоксилин-эозином) ($\times 100$): а — недифференцированная; б — низкодифференцированная; в — ганглионейробластома; г — зрелая ганглионеврома

Промежуточные прогностические факторы: возраст пациента старше 1 года, локализованная опухоль с поражением лимфатических узлов, у детей младше 1 года метастазы в кости и костный мозг, отсутствие амплификации гена *MYCN* и сегментных хромосомных aberrаций.

Факторы неблагоприятного прогноза включают: возраст пациента старше 1 года, метастазы в кости и костный мозг, сегментные хромосомные aberrации, такие как делеции субтеломерной области (del1p36) [27], длинного плеча хромосомы 11 (del11q), увеличение длинного плеча хромосомы 17 (+17q), амплификация гена *MYCN*, морфологически недифференцированная опухоль, высокий митотический индекс (см. таблицу).

Таким образом, определенный геномный ДНК-профиль опухоли предсказывает клиническую картину течения заболевания. Хромосомные aberrации могут изменять биологическое поведение опухолей в неблагоприятную сторону. Однако наибольшее значение в установлении прогноза, выборе оптимального объема лечения, устойчивости к химиотерапии приобрело изучение состояния гена *MYCN*.

Характеристика и функции гена *MYCN*

MYCN — клеточный протоонкоген семейства транскрипционных факторов. Он кодирует один из ядерных белков, который участвует в создании транскрипционных регуляторных комплексов со специфическими ДНК-связывающими свойствами. Распологается ген *MYCN* на коротком плече хромосомы 2 в локусе 2p24. Известно, что белки семейства MYC играют центральную роль в контроле клеточного цикла, клеточной пролиферации. *MYCN* выполняет важную регуляторную функцию в процессе миграции стволовых клеток, модуляции апоптоза, плюропотентности и дифференцировки [9, 16, 30]. Онкоген *MYCN* также регулирует гены множественной лекарственной устойчивости — *MRP1* и *MDR1* [31]. Важно отметить, что *MYCN* контролирует белки, участвующие в биогенезе рибосом, тем самым влияя на синтез белка. В нормальных клетках уровень белка *MYCN* строго регулируется фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K), которая стабилизирует белок и регулирует его включение в клеточный цикл [9].

Прогностические факторы нейробластомы

Характеристика	Прогностический фактор	
	благоприятный	неблагоприятный
Возраст	Младше 1 года	Старше 1 года
Клиническая стадия	I, II, IVS	III, IV
Гистологическое строение	Богатые шванновской стромой, дифференцированные	Бедные шванновской стромой, богатые стромой и нодулярные
Хромосомные aberrации	Отсутствует амплификация гена <i>MYCN</i> , делеция локуса 1p36 и другие сегментные хромосомные aberrации	Наличие амплификации гена <i>MYCN</i> , делеции локуса 1p36 и/или другие сегментные хромосомные aberrации

Амплификация гена *MYCN*.**Особенности при нейробластоме**

Амплификация ДНК — механизм, с помощью которого клетки злокачественной опухоли приобретают многочисленные копии части своего генома, что приводит к гиперэкспрессии клеточных онкогенов, посредством которой опухолевая клетка получает преимущество в росте и устойчивость к химиотерапии. Ген *MYCN* является первым онкогеном в солидных опухолях, для которого была обнаружена амплификация (более чем 4-кратное увеличение количества этого гена по сравнению с референсным участком, локализуемым на этой же хромосоме, чаще всего это центромерная область). Уровень амплификации этого гена при нейробластоме находится в диапазоне от 4- до 500-кратного увеличения, чаще от 50- до 100-кратного. Туморогенный потенциал *MYCN* связан именно с процессом амплификации, так как функциональные мутации в его пределах не обнаружены [16].

Амплификация *MYCN* наблюдается в 20–30 % первичных нейробластом [16, 27, 32] и является одним из главных показателей агрессивности заболевания, ранней устойчивости к химиотерапии и неблагоприятного прогноза. Амплификация этого гена — мощнейшая «движущая сила» для увеличения митотической активности и предотвращения созревания опухоли. Нейробластомы с амплификацией *MYCN* являются, как правило, недифференцированными или низкодифференцированными опухолями с высоким митотическим индексом и классифицируются как неблагоприятная гистологическая группа [28]. Корреляция между амплификацией гена *MYCN* и неблагоприятным исходом подтверждена в ходе многочисленных исследований, однако аналогичная ассоциация между экспрессией *MYCN* и исходом остается спорной.

В ряде доклинических исследований показано, что низкие уровни MYC-белков увеличивают пролиферацию, а высокие нужны для индукции апоптоза. Если это верно для нейробластомы, то предполагается, что амплификация гена *MYCN* служит в первую очередь для нарушения регуляции функции белка MYCN во время клеточного цикла, а не просто для увеличения его экспрессии. Эта гипотеза согласуется с утвержде-

нием, что именно амплификация, а не гиперэкспрессия, является показателем агрессивности заболевания [9]. При анализе нейробластом без амплификации гена *MYCN* было показано, что все пациенты с опухолями, в которых зафиксирован высокий уровень экспрессии MYCN, имели благоприятный исход болезни, без рецидивов и метастазов [6]. Также показано, что клетки с гиперэкспрессией MYCN сохраняют способность к дифференцировке [33]. Механизмы, посредством которых амплификация гена *MYCN* приводит к развитию агрессивной и резистентной опухоли, остаются неясными.

Размер ампликонов гена *MYCN* при нейробластоме может варьировать от 350 kb до 8 Mb, при этом наблюдается высокая вариабельность количества коамплифицированных генов. Часто коамплифицируется ген *DDXI* (локус 2p24), принадлежащий к семейству генов, кодирующих белки DEAD-бокса (Asp–Glu–Ala–Asp), вовлеченные в ряд клеточных процессов, таких как посттранскрипционная и трансляционная регуляция генов. Кроме того, опубликованы данные, касающиеся экспрессии гена *ID2* (ингибитор ДНК-связывания/дифференцировки), расположенного в локусе 2p25.1.

Ген *NAG* (*NBAS*, neuroblastoma amplified gene), также локализованный в локусе 2p24.3, коамплифицируется в 20–56 % нейробластом. Следует отметить, что случаи амплификации данного гена зафиксированы только в опухолях с амплификацией *MYCN*, и никогда в отсутствие последней. Продукт этого гена входит в состав комплекса, обеспечивающего белковый транспорт в системе эндоплазматического ретикула аппарата Гольджи [34]. Наконец, коамплификация гена *ALK* происходит редко и наблюдается только в случаях с плохим исходом [35].

Группа японских ученых [36] исследовала активность фермента теломеразы в 100 образцах нейробластомы. Теломеры — специальные структуры на концах хромосом, которые вовлечены в процесс репликации и играют важную роль в обеспечении генетической стабильности. Регуляция длины теломер контролируется ферментом теломеразой. В опухолевых и стволовых клетках наблюдают высокую экспрессию теломер-

разы, в результате чего длина теломерных участков хромосом этих клеток увеличивается или сохраняется на постоянном уровне, позволяя им делиться неограниченно долго. Все нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* демонстрируют высокую теломеразную активность (это ассоциировано с плохим прогнозом и высокой генетической нестабильностью). Однако большинство нейробластом стадии IVS имели низкую теломеразную активность или короткие теломеры [5, 36, 37]. Таким образом, длина теломер является весьма важным прогностическим параметром клинической значимости у больных с диагнозом нейробластомы [38].

Примечательно, что и при отсутствии амплификации гена *MYCN* клетки нейробластомы могут содержать от 1 до 4 лишних копий этого гена относительно количества центромер хромосомы 2. Опухолевые клетки могут получить небольшое количество дополнительных копий гена посредством следующих механизмов:

- увеличение количества копий только короткого плеча хромосомы 2 или изохромосомы 2p (рис. 2) [39];
- дупликация гена *MYCN in situ* в локусе 2p24 (показано на 2 клеточных линиях);
- несбалансированная транслокация дистального конца короткого плеча хромосомы 2 (и, следовательно, *MYCN* и соседних генов) на другие хромосомы (ранее продемонстрировано на 5 клеточных линиях без амплификации гена *MYCN* и на некоторых первичных опухолях) [32].

Эти данные свидетельствуют о том, что присутствие дополнительных копий гена *MYCN* в неамплифицированной нейробластоме позволяет выявить клетки с комбинированными (сегментными и количествен-

ными) генетическими нарушениями, которые впоследствии помогают понять поведение этих опухолей [16].

Следует отметить, что в опухолях, которые имели амплификацию гена *MYCN*, наблюдали широкую внутриклеточную вариабельность в количестве копий этого гена [30].

Методы определения статуса гена *MYCN*

Надежное и своевременное определение амплификации гена *MYCN* — это ключевая точка в лечении нейробластом. На практике амплификация этого гена устанавливается разными способами.

До июля 1993 г. количество копий гена *MYCN* определяли с помощью Саузерн-блот-гибридизации. Однако с июля 1993 г. приобрел популярность и стал широко использоваться метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) для определения наличия амплификации гена *MYCN* [15, 40].

При сравнении этих 2 методов было показано, что при Саузерн-блот-анализе наряду с опухолевыми клетками нормальные клетки были также включены в исследование, тогда как при FISH-анализе каждое опухолевое ядро идентифицировалось отдельно [15, 16, 30]. Саузерн-блот-гибридизация без стандартизации сигнала для одной копии хромосомы 2 может привести к явной демонстрации амплификации гена *MYCN* вследствие анеуплоидии хромосомы 2 [30], тогда как для интерфазной FISH-реакции эта проблема была решена путем одновременной гибридизации со специфической α -сателлитной пробой, что позволяет прямо пересчитывать количество хромосомы 2 по отношению к количеству генов *MYCN*. Важно отметить, что количество копий одной хромосомы в клетках опухоли не обязательно отражает пloidность опухоли [3].

Таким образом, в настоящее время метод FISH является основным для оценки статуса гена *MYCN* («золотым стандартом» для характеристики нейробластомы). К преимуществам FISH следует отнести скорость и техническую простоту данного метода, а также возможность определять гетерогенность амплификации гена *MYCN* между отдельными нейробластами в пределах одной опухоли [39] как в интерфазных, так и метафазных ядрах. Одновременный анализ метафазных хромосом — важное дополнение к интерфазным исследованиям, так как позволяет получить ценную информацию о типе амплификации гена *MYCN*: экстрахромосомная (наличие двойных ацентричных хромосом, double minute — dmin) (рис. 3а), реже — внутривнутрихромосомная (гомогенно окрашенные регионы, homogeneous stain region — HSR) (рис. 3б) или анеуплоидия хромосомы 2 (рис. 3в) [15, 16, 30].

Если речь идет о клинических образцах нейробластом, то метод интерфазной FISH позволяет быстро и надежно определить наличие амплификации гена *MYCN* даже в образцах, содержащих малое количество опухолевых клеток. Для младенцев и детей младшего

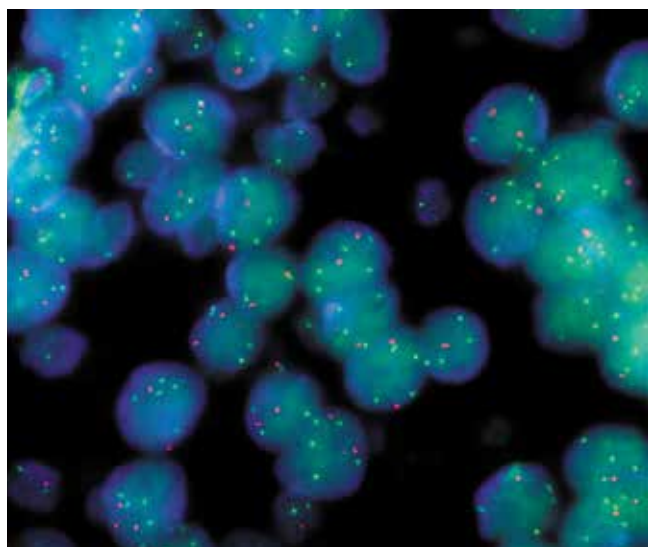


Рис. 2. Увеличение количества копий короткого плеча хромосомы 2 (FISH-реакция с флуоресцентным зондом LSI *MYCN* (2p24) Spectrum Green/CEP 2 (2p11.1-q11.1 Spectrum Orange) Dual ColorProbe, Abbott-Molecular, $\times 1000$). Сигналы зеленого цвета — ген *MYCN*, красного — центромер хромосомы 2

возраста с подозрениями на нейробластому способность оценивать амплификацию гена в небольших образцах ткани, в том числе при тонкоигльной пункции опухоли или костного мозга, может служить альтернативой более инвазивным диагностическим хирургическим процедурам.

К недостаткам FISH следует отнести дороговизну, трудоемкость данного метода и сложности реализации мультиплексного анализа [17].

Гетерогенность амплификации гена *MYCN*

В некоторых случаях нейробластом описана внутриопухолевая гетерогенность копий *MYCN*. Она наблюдается как в локализованных, так и в диссеминированных опухолях. Различают 3 типа гетерогенности [39]:

- гетерогенность по клеткам — кластеры амплифицированных клеток, окруженные опухолевыми клетками без амплификации гена, и/или в опухоли встречаются единичные клетки с амплификацией гена *MYCN*. Такой тип гетерогенности чаще наблюдается в нейробластомах III и IV стадий и метастатических опухолях;
- гетерогенность наблюдается в первичном очаге и метастазе (амплификация гена *MYCN* в метастазе нейробластомы в костный мозг и отсутствие в первичной опухоли);
- гетерогенность по времени (появление амплификации гена *MYCN* в процессе течения болезни, часто после рецидива).

Клиническое значение гетерогенности амплификации гена *MYCN* практически не исследовано.

Механизм формирования амплификации

Несмотря на десятилетия интенсивных исследований, молекулярные механизмы амплификации гена остаются не полностью изученными. Тем не менее последние данные молекулярного анализа и цитогенетических исследований предлагают один часто используемый механизм формирования хромосомной нестабильности, который начинается с продукции ацентрических, циркулярных, экстрахромосомальных молекул ДНК, реплицирующихся автономно. Амплификация гена — результат неравномерной митотической сегрегации и аккумуляции этих элементов в определенных условиях. В большинстве случаев первоначально сформированные циркулярные ДНК очень малы и не могут быть визуализированы световым микроскопом, но они увеличиваются со временем и формируют гетерогенные по размеру двойные минихромосомы. Последние данные демонстрируют хронологию амплификации гена, в которой первоначальные экстрахромосомальные элементы интегрируются и образуют внутрихромосомные регионы амплификации гена. Процесс амплификации коротко можно описать по следующей схеме: вырезание, циркуляция, внутренняя реорганизация, амплификация и (при формировании HSR) внутрихромосомная интеграция и даль-

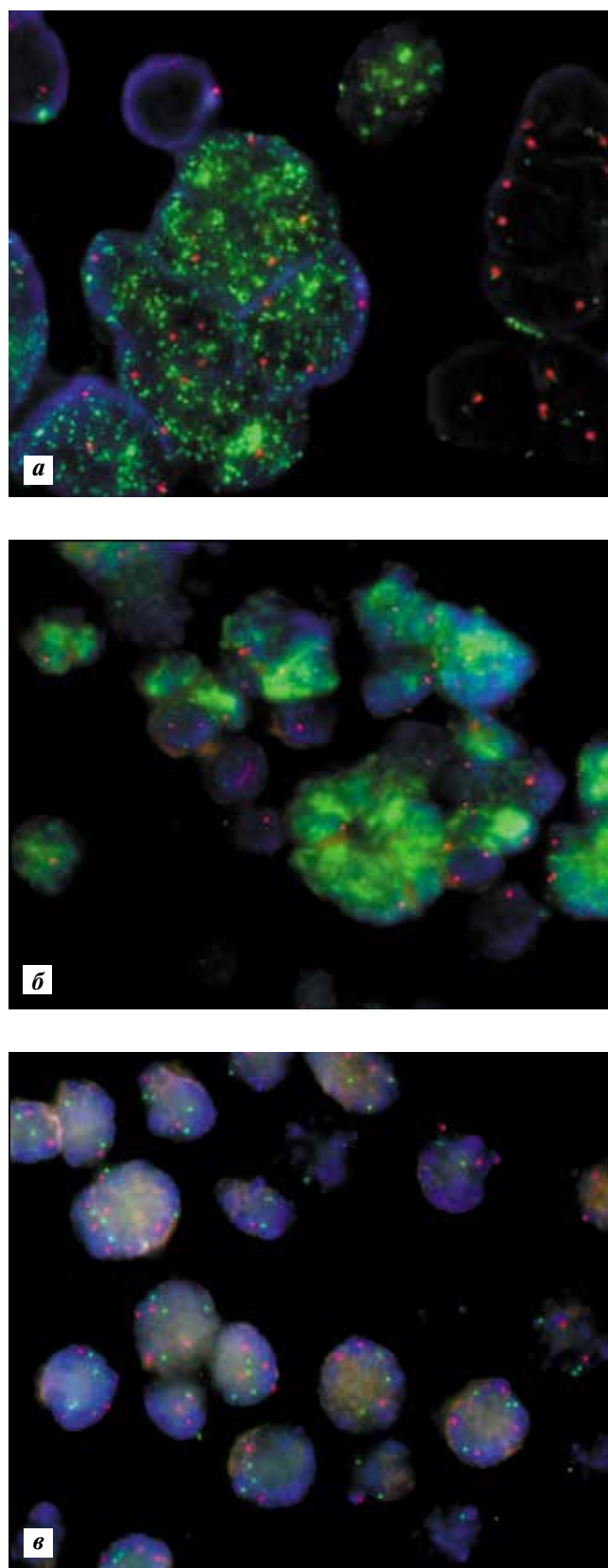


Рис. 3. Типы амплификации гена *MYCN* и анеуплоидия хромосомы 2 (FISH-реакция с флуоресцентным зондом LSI *MYCN* (2p24) Spectrum Green/CEP 2 (2p11.1-q11.1) Spectrum Orange Dual ColorProbe, AbbottMolecular). Сигналы зеленого цвета — ген *MYCN*, красного — центромер хромосомы 2: а — в виде *dmn* ($\times 1000$); б — в виде HSR ($\times 1000$); в — анеуплоидия хромосомы 2 ($\times 1000$)

нейшая амплификация [41–43]. Тип амплификации в виде HSR является более стабильным, так как при делении дополнительные копии гена могут передаваться дочерним клеткам [40]. В некоторых случаях dmin или HSR могут формироваться без предшественников [41].

Встречающуюся гетерогенность количества копий гена *MYCN* от клетки к клетке можно объяснить неравномерным разделением двойных минихромосом между дочерними клетками в процессе митоза, в результате которого они могут быть объединены в микроядра или потеряны через какое-то время [30, 40].

Типы амплификации гена *MYCN* и их прогностическое значение при нейробластоме. Элиминация амплифицированных последовательностей

Удобной моделью для изучения разных типов амплификации (dmin и HSR) послужила клеточная линия HL-60, полученная из крови больного острым промиелоцитарным лейкозом. На ранних стадиях культивирования клеток линии HL-60 амплификация гена *MYC* наблюдалась в виде dmin, которые затем заменялись HSR на более поздних стадиях культивирования [41]. При сравнении опухолевых клеток с разными типами амплификации значительной разницы в этих субгруппах по интенсивности роста или устойчивости к химиотерапии не выявлено. Тем не менее показано, что в опухолевых клетках, имеющих амплификацию гена *MYC* в виде HSR, не наблюдался апоптоз после дифференцировки, и после отмены химиопрепарата клетки возвращались в недифференцированное состояние. В тех клетках, которые содержали dmin, наблюдали существенное уменьшение уровня экспрессии *MYC*. Это предполагает, что клетки с амплификацией в виде HSR не так восприимчивы к действию дифференцирующих

агентов, возможно, из-за развития дополнительных механизмов резистентности [40].

Что касается нейробластомы, проведено исследование наличия возможной корреляции между разными типами амплификации гена *MYCN* и основными факторами риска при нейробластоме (возраст, стадия, плоидность и гистологическое строение нейробластомы по классификации Н. Shimada). Никакой статистически значимой ассоциации между этими параметрами выявлено не было. Однако отмечено, что опухоли с амплификацией гена *MYCN* в виде dmin по сравнению с HSR преобладали у пациентов более старшего возраста с поздними стадиями нейробластомы и наличием метастазов [40]. Не выявлено также различий между безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных минихромосом и HSR [44].

При исследовании *in vitro* dmin отмечен интересный факт: они могут быть элиминированы (удалены) из ядра [40, 45, 46]. Подобное явление наблюдали также *in vivo* в клетках нейробластомы. Удаленные последовательности ДНК выглядят как микроядра (мелкие ядерноподобные структуры). Микроядра возникают во время S-фазы путем почкования или после митоза при перестройке ядерной мембраны (рис. 4а, б). Они могут содержать не только амплифицированные онкогены, но также фрагменты ацентричных хромосом или целые поврежденные хромосомы. Размер микроядер может варьировать в пределах одной опухоли. Одно из возможных объяснений этого — разное количество содержащейся в них ДНК [47]. Возникает вопрос: зачем клетке удалять последовательности, которые она же ранее амплифицировала (накапливала)? Ведь при этом появляется явное противоречие между двумя событиями, так как амплификация генов при-

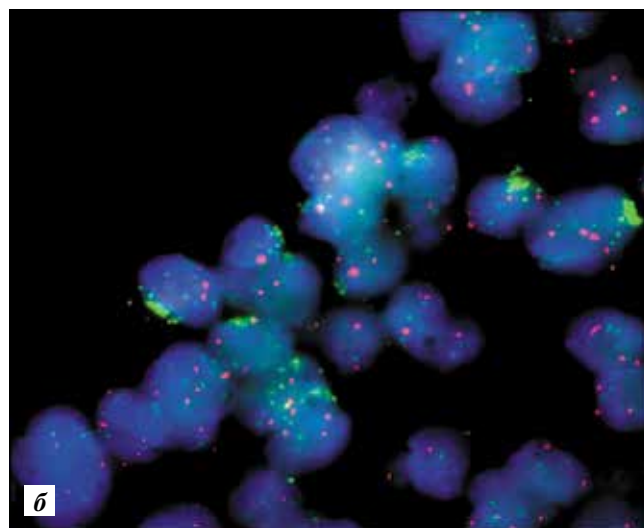
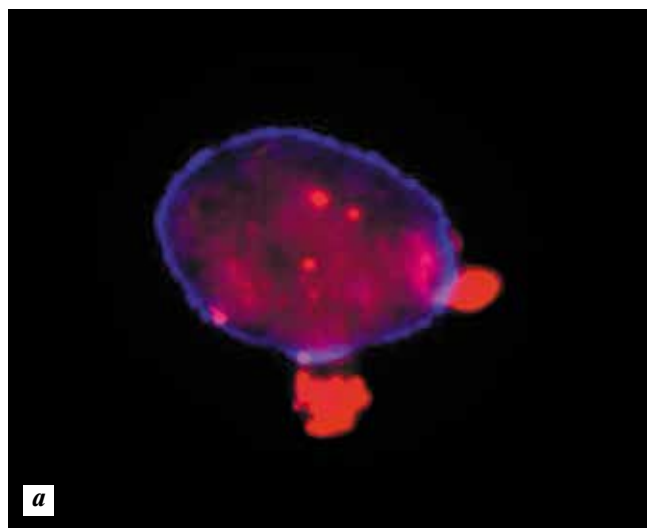


Рис. 4. Механизмы формирования микроядер при элиминации амплифицированных последовательностей из ядра: а — путем почкования ядерной мембраны (FISH-реакция с флуоресцентным зондом *LSI MYCN Spectrum Orange DNA Probe*, AbbottMolecular, $\times 1000$); б — периферическая локализация dmin перед элиминацией их из ядра (FISH-реакция с флуоресцентным зондом *LSI MYCN (2p24) Spectrum Green/CEP 2 (2p11.1-q11.1) Spectrum Orange*, $\times 1000$)

дает клетке селективное преимущество, а спонтанная элиминация амплифицированных последовательностей может подавить опухолевый фенотип. Но в этом случае механизм экстрюзии рассматривается как самозащита клетки при избыточном количестве содержащихся в ней последовательностей. Существует строгая «архитектура» ядра, и в нем соблюдается определенное распределение последовательностей хромосом, поэтому не исключено, что если амплификация превышает ядерное пространство, то клетка должна удалить избыток генов путем экстрюзии. Потеря клеткой амплифицированных последовательностей коррелирует с потерей злокачественных свойств и клеточной дифференцировкой [31].

Хотя амплификация гена *MYCN* — признак неблагоприятного исхода болезни, иногда агрессивное течение заболевания наблюдается в отсутствии амплификации данного гена. Это значит, что существуют другие генетические пути, влияющие на развитие нейробластом с плохим прогнозом [44].

Хромосомные aberrации при нейробластоме

Амплификация онкогена *MYCN* часто сопровождается делецией 1p36 [3] и увеличением плеча 17q, реже — делецией 11q23 [27, 29].

Как было описано выше, делеция в коротком плече хромосомы 1 (1p36) — наиболее частая структурная хромосомная aberrация при нейробластоме (около 30 %) и встречается у пациентов с плохим прогнозом [3]. При изучении большой группы пациентов ($n = 915$) с нейробластомой была выявлена ассоциация между делецией локуса 1p36 (23 %) и наличием неблагоприятных прогностических факторов (возраст пациента старше 1 года, IV стадия заболевания, амплификация гена *MYCN*, неблагоприятная гистологическая категория по Н. Shimada и диплоидность). У пациентов, которые имели делецию локуса 1p36, 3-летняя безрецидивная и общая выживаемость были ниже на 30 и 20 % соответственно по сравнению с пациентами, в опухоли которых не определялась потеря локуса 1p36 [44, 27]. Европейские исследователи придерживаются точки зрения, согласно которой необходимо проводить анализ статуса 1p в клетках нейробластомы для определения группы риска и своевременной более эффективной терапии пациентов.

В спонтанно дифференцирующихся и богатых стромой нейробластомах делецию 1p36 не выявляли. Эти наблюдения позволяют предположить, что гены, ассоциированные с дифференцировкой, находятся в этом регионе. Рядом европейских исследователей

показано, что благоприятные гистологические структуры, такие как наличие ганглиозных клеток и обилие шванновской стромы, коррелируют с благоприятными генетическими результатами. С другой стороны, ни одна из опухолей с делецией 1p не показала спонтанного развития шванновской стромы [3].

Увеличение длинного плеча хромосомы 17 (+17q) — добавление 1–3 лишних копий — впервые описано около 30 лет назад. Изучению этой aberrации уделялось мало внимания, но с появлением новых молекулярных цитогенетических исследований обнаружено, что это нарушение встречается в половине всех первичных опухолей. Клиническое значение этой aberrации противоречиво. С одной стороны, немецкие ученые показали, что увеличение длинного плеча хромосомы 17 не оказывает существенного влияния на прогноз заболевания [48]. С другой стороны, исследователи отметили, что данная aberrация ассоциируется с более агрессивным течением болезни и неблагоприятным прогнозом [44, 49]. В первичных нейробластомах амплификация гена *MYCN* часто ассоциирована с увеличением длинного плеча хромосомы 17, и само по себе это является неблагоприятным прогностическим фактором, так как плечо 17q считается удобным местом для интеграции амплифицированных последовательностей гена *MYCN* [40].

Делеция длинного плеча хромосомы 11 с высокой частотой наблюдается у больных нейробластомой с неамплифицированным геном *MYCN* в возрасте от 2,5 до 7 лет и ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с клиническими стадиями II или IVS [10, 29]. Существует также обратная корреляция между наличием в опухоли делеции 11q и амплификацией гена *MYCN* [16]. Американские исследователи выдвинули предложение считать потерю локуса 11q23 полезным прогностическим маркером в случаях, связанных с низким (I, II или IVS стадии) или средним (благоприятная III стадия или младенцы с IV стадией без амплификации гена *MYCN*) риском течения нейробластомы [27, 29, 50].

Заключение

Совершенствование методологических подходов, дающее возможность точно определять генетические нарушения, ассоциированные с высоким риском опухоли, такой как нейробластома, приведет к правильному и своевременному лечению и четкому пониманию молекулярных событий, результатом которых является злокачественная трансформация и опухолевая прогрессия.

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

1. Cushing H., Wolbach S.B. The transformation of a malignant paravertebral sympathico-blastoma into a benign ganglioneuroma. *Am J Pathol* 1927;3(3):203–16.
2. Everson T.C., Cole W.H. Spontaneous regression of neuroblastoma: Spontaneous Regression of Cancer. Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1966.
3. Ambros I.M., Zellner A., Roald B. et al. Tyrrole of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334(23):1505–11.
4. Beckwith J.B., Perrin E.V. *In situ* neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 1963;43(6):1089–104.
5. Brodeur G.M., Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11(12):704–13.
6. Matsunaga T., Shirasawa H., Hishiki T. et al. Enhanced expression of *N-myc* messenger RNA in neuroblastomas found by mass screening. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3199–204.
7. Maris J.M. Recent Advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362(23):2202–11.
8. Mosse Y.P., Laudenslager M., Longo L. et al. Identification of *ALK* as the major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455(7215):930–5.
9. Gustafson W.C., Weiss W.A. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* 2010;29(9):1249–59.
10. Cohn S.L., Pearson A.D., London W.B. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):289–97.
11. Acosta S., Lavarino C., Paris R. et al. Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells. *BMC Dev Biol* 2009;9:12.
12. Papac R.J. Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treat Rev* 1996;22(6):395–423.
13. Cole W.H., Everson T.C. Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Ann Surg* 1956;144(3):366–83.
14. Wilson L.M., Draper G.J. Neuroblastoma, its natural history and prognosis: a study of 487 cases. *Br Med J* 1974;3(3):301–7.
15. Georg R.E., London W.B., Cohn S.L. et al. Hyperdiploidy plus nonamplified *MYCN* confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6466–73.
16. Jeison M., Ash S., Halevy-Berko G. et al. 2p24 Gain region harboring *MYCN* gene compared with *MYCN* amplified and non amplified neuroblastoma. *Am J Pathol* 2010;176(6):2616–25.
17. Villamón E., Piqueras M., Mackintosh C. et al. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch* 2008;453:47–55.
18. Iehara T., Hiyama E., Tajiri T. et al. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? *Eur J Cancer* 2012;48(11):1707–12.
19. Monclair T., Brodeur G.M., Ambros P.F. et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):298–303.
20. Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P. et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86(2):364–72.
21. Sukanuma R., Wang L.L., Sano H. et al. Peripheral neuroblastic tumors with genotype-phenotype discordance: a report from the Children's Oncology Group and the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(3):363–70.
22. London W.B., Castleberry R.P., Matthay K.K. et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23(27):6459–65.
23. El-Sayed M.I., Ali A.M., Sayed H.A. et al. Treatment results and prognostic factors of pediatric neuroblastoma: a retrospective study. *Int Arch Med* 2010;3:37.
24. Teshiba R., Kawano S., Wang L.L. et al. Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Dev Pathol* 2014;17(6):441–9.
25. Look A.T., Hayes F.A., Shuster J.J. et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and *N-myc* gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991;9(4):581–91.
26. Ladenstein R., Ambros I.M., Pötschger U. et al. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36(1):83–92.
27. Attiyeh E.F., London W.B., Mosse Y.P. et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005;353(21):2243–53.
28. Nakazawa A., Haga C., Ohira M. et al. Correlation between the International Neuroblastoma Pathology Classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Sci* 2015;106(6):766–71.
29. Cetinkaya C., Martinsson T., Sandgren J. et al. Age dependence of tumor genetics in unfavorable neuroblastoma: arrayCGH profiles of 34 consecutive cases, using a Swedish 25-year neuroblastoma cohort for validation. *BMC Cancer* 2013;13:231.
30. Shapiro D.N., Valentine M.B., Rowe S.T. et al. Detection of *N-myc* gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 1993;142(5):1339–46.
31. Valent A., Benard J., Clausse B. et al. *In vivo* elimination of acentric double minutes containing amplified *MYCN* from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. *Am J Pathol* 2001;158(5):1579–1584.
32. Valent A., Le Roux G., Barrois M. et al. *MYCN* gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumor cells without amplification. *J Pathol* 2002;198(4):495–501.
33. Fredlund E., Ringner M., Maris J.M., Pählman S. High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(37):14094–9.
34. Aoki T., Ichimura S., Itoh A. et al. Identification of the neuroblastoma-amplified gene product as a component of the syntaxin 18 complex implicated in Golgi-to-endoplasmic reticulum retrograde transport. *Mol Biol Cell* 2009;20:2639–49.
35. Stock C., Bozsaky E., Watzinger F. et al. Genes proximal and distal to *MYCN* are highly expressed in human neuroblastoma as visualized by comparative expressed sequence hybridization. *Am J Pathol* 2008;172(1):203–14.
36. Hiyama E., Hiyama K., Yokoyama T. et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995;1(3):249–55.
37. Pezzolo A., Pistorio A., Gambini C. et al. Intratumoral diversity of telomere length in individual neuroblastoma tumors. *Oncotarget* 2014;6(10):7493–503.
38. Ohali A., Avigad S., Ash S. et al. Telomere Length Is a Prognostic Factor in Neuroblastoma. *Cancer* 2006;107(6):1391–9.
39. Theissen J., Boensch M., Spitz R. et al. Heterogeneity of the *MYCN* oncogene in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(6):2085–90.
40. Moreau L.A., McGrady P., London W.B. Does *MYCN* amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A children's oncology group study. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5693–7.
41. Wahl G.M. The Importance of Circular DNA in Mammalian gene amplification. *Cancer Res* 1989;49:1333–40.
42. Storlazzi C.T., Lonoce A., Guastadisegni M.C. et al. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: origin and structure. *Genome Res* 2010;20(9):1198–206.

43. L'Abbate A., Macchia G., D'Addabbo P. et al. Genomic organization and evolution of double minutes/homogeneously staining regions with MYC amplification in human cancer. *Nucleic Acid Res* 2014;42(14):9131–45.
44. Yong M.H., Hwang W.S., Knight L.A. et al. Comparing histopathological classification with MYCN, 1p36 and 17q status detected by fluorescence *in situ* hybridization from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. *Singapore Med J* 2009;50(11):1090–4.
45. Ambros I.M., Rumpler S., Luegmayr A. et al. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary *MYCN* gene copies by micronucleus formation – sign of tumor cell revertance? *Eur J Cancer* 1997;33(12):2043–9.
46. Shimizu N., Shimura T., Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res* 2000;448(1):81–90.
47. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol* 1998;140(6):1307–20.
48. Spitz R., Hero B., Ernestus K., Berthold F. Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:4835–40.
49. Tajiri T., Tanaka S., Shono K. et al. Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2001;166(1):89–94.
50. Spitz R., Hero B., Simon T., Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(11):3368–73.

Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка

Н.Н. Колесников¹, С.Е. Титов^{1,2}, Ю.А. Веряскина¹, А.В. Владимирова³, Р.Б. Самсонов^{3,4},
А.С. Артемьева³, В.И. Новик³, Л.М. Берштейн³, И.Ф. Жимулев¹, А.В. Малек^{3,4}

¹ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения РАН;
Россия, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8/2;

²ЗАО «Вектор-Бест»; Россия, 630117, Новосибирск-117;

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

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

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Актуальность. Рак молочной железы — самое распространенное злокачественное новообразование у женщин. Биопсия ткани опухоли молочной железы является ключевым этапом диагностики, позволяющим оценить природу новообразования и определить тактику лечения. В клинической практике применяются методы трепан-биопсии и тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ). Последний вариант менее травматичен, но используется реже по причине меньшей информативности. Кроме того, при любом из двух методов существует риск забора малоинформативного образца, а точность диагноза определяется квалификацией гистолога/цитолога. Возможность использовать биопсийный материал для анализа онкомаркеров в дополнение к стандартному исследованию открывает перспективы существенного повышения информативности и объективности традиционных подходов, включая метод ТАПБ. Среди потенциальных онкомаркеров особое место занимают микроРНК (миРНК) — класс регуляторных молекул, играющих важную роль в различных физиологических и патологических процессах. Неопластическая трансформация протокового эпителия молочных желез сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии миРНК. Оценка этих изменений имеет большой диагностический потенциал.

Цель исследования — разработка и оценка перспективы внедрения в клиническую практику метода анализа миРНК в материале цитологических препаратов.

Материалы и методы. В исследовании использованы архивные цитологические препараты, по которым ранее был установлен диагноз доброкачественной или злокачественной опухоли молочной железы. Оценка экспрессии миРНК проводили методом обратной транскрипции и последующей количественной полимеразной цепной реакции. При анализе результатов были использованы соответствующие данные ранее проведенных цитологических и гистологических исследований.

Результаты. Разработан метод выделения РНК из препаратов, приготовленных для традиционного цитологического исследования. Проведен анализ экспрессии 9 миРНК. Сравнение результатов анализа материала доброкачественных и злокачественных образований показало статистически значимую разницу экспрессии 5 миРНК: миРНК-21, -205, -125b, -200a и -221. Наиболее значимую разницу наблюдали для миРНК-125b: в ходе неопластической трансформации уровень экспрессии этой молекулы снижается в 500 раз. Установлена корреляция экспрессии некоторых миРНК с рядом клинически значимых характеристик опухолевой ткани.

Заключение. Результаты работы показали возможность оценки экспрессии миРНК в материале ТАПБ образований молочной железы и целесообразность ее использования в дополнение к традиционному цитологическому исследованию в целях уточнения диагноза и оптимизации выбора терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, диагностика, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия, микроРНК, миРНК-125b

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-44-52

Improvement of accuracy and diagnostic significance of breast tumor fine-needle aspiration biopsy by miRNA analysis of material isolated from cytological smears

N.N. Kolesnikov¹, S.E. Titov^{1,2}, Yu.A. Varyaskina¹, A.V. Vladimirova³, R.B. Samsonov^{3,4},
A.S. Artem'eva³, V.I. Novik³, L.M. Bershteyn³, I.F. Zhimulev¹, A.V. Malek^{3,4}

¹Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences;
8/2 Acad. Lavrentyeva prospekt, Novosibirsk, 630090, Russia;

²ZAO "West-Best"; Novosibirsk-117, 630117, Russia;

³N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia;
68 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg, 197758, Russia;

⁴ООО "Onkosistema"; 11 Khoshimina St., Saint Petersburg, 194356, Russia

Relevance. Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women. Tumor biopsy, a key diagnostic approach, is required to evaluate the nature of tumor and to determine the therapeutic strategy. In clinical practice methods are being applied: trepan-biopsy and fine needle aspiration biopsy (FNAB). The latter is less traumatic however is used less often because it provides with less information. Moreover, dependence from quality of biopsy and qualification of morphologist are attributes of both techniques. A possibility to use biopsy material for farther analysis of tumor-markers would open a perspective to obtain more information and to improve objectivity of traditional diagnostic approaches, including FNAB. MicroRNAs (miRNAs), regulatory molecules involved in control of virtually all physiologic and pathologic process, emerged as promising tumor markers. Malignant transformation of mammary gland epithelia is associated with specific alterations of cellular miRNAs profile. Analysis of these alterations is of great diagnostic potency.

Objective. Development of method for miRNAs analysis in cytological smears material and evaluation of its practical applicability.

Material and methods. Archived cytological material (smears on the glass slides) from patients with benign tumor and breast cancer was used. Analysis of miRNAs expression was performed by reverse transcription followed by quantitative PCR. Results of reverse transcription polymerase chain reaction were analyzed with use of relevant cytological and morphological data.

Results. Method of miRNAs analysis in material of cytological smears was developed. Expression of 9 miRNAs in 80 samples was evaluated. Statistically significant expression difference between benign and malignant tumor samples was found for 5 miRNAs: miR-21, miR-205, miR-125b, miR-200a, miR-221. MiR-125b exhibited most prominent expression dysregulation: malignant transformation of mammary epithelium is associated with 500 fold decrease of miR-125b expression level. Expression alterations of several miRNAs were revealed to correlate with clinically relevant characteristics of tumors.

Conclusions. Results of our study indicated the possibility of miRNAs expression analysis in the FNAB material and the applicability of this method as additive approach to the convention cytological examination. Application of this method will allow to specify diagnosis and to optimize choice of the therapeutic strategy.

Key words: breast cancer, diagnostics, fine needle aspiration biopsy, microRNA, miR-125b

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — самое распространенное злокачественное новообразование у женщин. В 2012 г. заболеваемость и смертность от РМЖ в России составили 46,17 и 15,94 случая на 100 тыс. женщин соответственно [1]. Это означает, что каждый год в нашей стране около 60 тыс. женщин заболевают и более 22 тыс. погибают от РМЖ. Эффективность лечения во многом определяется стадией впервые выявленного заболевания. Пятилетняя выживаемость при I и II стадиях составляет 93–100 %, в то время как при III и IV стадиях — лишь 72 и 22 % соответственно. В нашей стране диагноз РМЖ в 65 % случаев устанавливается на I и II стадиях заболевания, в 25 % — на III, и в 10 % — на IV [1]. Эта статистика отчетливо показывает необходимость разработки новых эффективных и доступных методов ранней диагностики РМЖ.

В настоящее время нет надежных молекулярных маркеров, которые позволяли бы проводить скрининговые исследования в целях выявления пациенток с начальными формами РМЖ. Молекулярно-генетические исследования имеют в основном прогностическое значение и не могут серьезно улучшить диагностические показатели заболевания, которое в 90–95 % случаев носит спорадический (ненаследственный) характер. Основными методами ранней диагностики остаются пальпаторное исследование и скрининговые инструментальные методы (ультразвуковое исследование, маммография). Следующим шагом после обнаружения образования в ткани молочной железы в ходе пальпаторного или инструментального исследования является биопсия. Материал из образования может быть получен путем трепан-биопсии или тонкоигльной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ). Последний метод существенно менее травматичен

и болезненен. В течение многих лет в литературе обсуждается вопрос о возможности диссеминации клеток опухоли в результате трепан-биопсии, что является дополнительным аргументом в пользу ТАПБ [2]. Кроме того, по сравнению с трепан-биопсией и подготовкой гистологического препарата процедура забора материала проще, а приготовление препарата быстрее и дешевле в случае ТАПБ с последующим цитологическим исследованием. Несмотря на это, в современных клинических условиях трепан-биопсия выполняется чаще, так как она позволяет провести гистологическое и иммуногистохимическое исследования и получить клинически важную информацию, определяющую лечебную тактику. Цитологическое исследование дает существенно меньше информации и выполняется реже.

Открытие молекул-ингибиторов синтеза белков на посттранскрипционном уровне — микроРНК (миРНК) — предоставило новые возможности поиска тканевых онкомаркеров и анализа биопсийного материала [3, 4]. МиРНК играют существенную роль в процессе развития онкологических заболеваний, включая РМЖ, являясь непосредственными участниками процесса канцерогенеза и выполняя роль онкосупрессоров или онкогенов, через взаимодействие с соответствующими генами-мишенями [5]. Поскольку процесс неопластической трансформации протокового эпителия сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии миРНК, очевиден большой диагностический потенциал анализа миРНК в ткани опухоли [6, 7]. Например, показано, что специфические особенности профиля экспрессии миРНК позволяют дифференцировать различные молекулярно-генетические типы РМЖ [8, 9]. Особенности профиля экспрессии миРНК отличают трижды негативный тип (TNBC) РМЖ, что может найти применение в прогнозировании течения

заболевания [10], ответа на неоадьювантную терапию [11] и последующем развитии лекарственной резистентности [12]. Ввиду того, что миРНК регулируют миграционные и адгезивные характеристики опухолевых клеток, закономерна связь между профилем миРНК и метастатическим потенциалом опухоли или прогнозом заболевания [13]. Поэтому в течение последних нескольких лет ведется активная работа по созданию и оптимизации методов выделения и анализа миРНК в образцах опухолевой ткани, включая парафиновые блоки [14], материал трепан-биопсий [15], операционный материал [9].

С учетом малой инвазивности ТАПБ, большого потенциала расширения ее использования, относительной простоты выполнения представляется целесообразной разработка метода выделения и анализа миРНК из материала препаратов, приготовленных для цитологического исследования образований молочной железы. Важным с практической точки зрения является тот факт, что использование цитологических препаратов позволяет избежать дополнительных хирургических манипуляций и применять метод после или в дополнение к обычному цитологическому исследованию в случае необходимости уточнения диагноза. В перспективе после валидации метода и разработки четких алгоритмов интерпретации полученных данных анализ миРНК в материале цитологических препаратов поможет расширить показания к применению ТАПБ, которая является простым и доступным методом верификации диагноза РМЖ.

Основная цель исследования — оценка перспективы внедрения в клиническую практику метода анализа миРНК в материале цитологических препаратов. Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

- разработка метода выделения РНК из биопсийного материала цитологических препаратов;
- анализ профиля экспрессии миРНК, ассоциированных с РМЖ, в выделенном материале;
- сравнение уровня экспрессии выбранных миРНК в препаратах злокачественных (РМЖ) и доброкачественных (фиброаденома) образований молочной железы;
- анализ полученных экспрессионных данных в контексте результатов последующих гистологических исследований.

Материалы и методы

Материал. В исследовании использовали архивный материал от 80 пациенток, проходивших амбулаторное обследование в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в период 2013–2014 гг. в целях оценки природы новообразований молочной железы. Использование материала было одобрено этическим комитетом НИИ онкологии, все данные деперсонализированы. В исследование включены образцы материала, полученного для цитологического исследования в результате

ТАПБ ($n = 73$), мазки-отпечатки операционного материала ($n = 3$), отпечатки трепан-биоптатов ($n = 4$).

Для получения цитологического препарата проводили стандартную обработку стекол: мазок высушивали на воздухе, материал фиксировали 95 % этанолом 10 мин и окрашивали гематоксилин-эозином. Цитологическое исследование проводили с помощью световой микроскопии, по результатам которой в 51 случае была диагностирована карцинома, в 29 случаях — установлена доброкачественная природа образования (фиброаденома, пролиферация эпителия без атипии). Диагноз злокачественного образования во всех случаях подтвержден гистологически в ходе дальнейшего обследования.

Выделение РНК. Выделение суммарного пула РНК проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Концентрация выделенной РНК была в диапазоне от 17,5 до 463,0 нг/мкл. Количество РНК, выделенной из материала цитологического препарата, было достаточным для анализа уровня экспрессии миРНК. Чистоту препарата оценивали как отношение поглощения при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм. Препараты РНК считали годными для анализа при показателях абсорбции $A_{260/280} - 2,8$, $A_{260/230} - 1,8-2,2$, которые свидетельствуют о достаточной чистоте препарата.

Обратная транскрипция — количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) для получения кДНК проводили в объеме 30 мкл. Использовали готовые реакционные смеси «РеалБест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Реакцию выполняли в течение 30 мин при температуре $+42^{\circ}\text{C}$, после чего реакционную смесь инкубировали 2 мин при $+95^{\circ}\text{C}$ для инактивации обратной транскриптазы. Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Измерение уровней экспрессии миРНК выполняли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве референсного гена использовали малую ядерную РНК (яРНК) U6. Реакцию ПЦР проводили в объеме 30 мкл с применением готовой реакционной смеси «РеалБест Мастер микс» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и раствора прямых и обратных праймеров (5,0 мкМ) и зонда (2,5 мкМ). Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев при температуре $+94^{\circ}\text{C} - 2$ мин, 50 основных циклов денатурации при $+94^{\circ}\text{C} - 10$ с, отжига и элонгации при $+60^{\circ}\text{C} - 20$ с.

Анализ данных. Уровень экспрессии миРНК оценивали относительно уровня экспрессии малой яРНК U6, вычисляли по формуле $2^{(Ct\ U6 - Ct\ miR\ of\ interest)}$ и обозначали как ΔCt . Статистическую обработку проводили с применением непараметрического U-критерия

Манна–Уитни в программе Statistica 10.0. Чтобы оценить значимость выявленных различий, проводили математическую обработку методом построения ROC-кривой с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21.

Результаты

Различия профиля экспрессии микроРНК в цитологических препаратах злокачественных и доброкачественных образований молочной железы. Цитологический анализ клеточного материала пункционной биопсии направлен на установление характера образования и его доброкачественной или злокачественной природы. Это главный вопрос, который волнует при обследовании и пациентов, и лечащих врачей. Цитологи выносят решение на основе анализа морфологических признаков и особенностей исследуемых клеток. Дополнительная молекулярно-генетическая информация может быть полезна в сомнительных случаях. Поскольку микроРНК — непосредственные участники процессов канцерогенеза, главной задачей является установление различий в спектре экспрессии микроРНК между доброкачественными и злокачественными образованиями. Выбор микроРНК, включенных в исследование, был сделан на основе анализа собственных данных [4] и данных литературы (табл. 1). Сравнительный анализ 9 маркерных микроРНК в препаратах РМЖ ($n = 51$) и доброкачественных образований ($n = 29$) выявил различия как в сторону повышения (микроРНК-21, микроРНК-155, микроРНК-20a, микроРНК-146b, микроРНК-200a), так и по-

нижения (микроРНК-221, микроРНК-205 и микроРНК-125b) уровней их экспрессии в опухолевых клетках. Статистически значимая разница установлена для 5 микроРНК: микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-200a, микроРНК-205 и микроРНК-125b (см. табл. 1, рис. 1). Наиболее существенную разницу (понижение экспрессии в 500 раз) наблюдали для онкосупрессорной микроРНК-125b. Диагностическая значимость анализа этой микроРНК была оценена с помощью ROC-анализа (рис. 2), который показал, что микроРНК-125b может быть использована в качестве классификатора в ходе дифференциальной диагностики РМЖ и доброкачественных новообразований (площадь под кривой составила 0,86). Таким образом, мы продемонстрировали возможность экстракции РНК из материала цитологических препаратов, полученных после ТАПБ, и выявили различия в спектрах экспрессии микроРНК между злокачественными и доброкачественными новообразованиями молочной железы.

Алгоритм анализа профиля экспрессии микроРНК для уточнения цитологического диагноза. В клинической практике приобретает все большее значение разработка алгоритмов интерпретации результатов анализа индивидуальных профилей микроРНК. Как было показано, существенное и достоверно значимое снижение уровня экспрессии микроРНК-125b может являться критерием диагноза РМЖ, и микроРНК-125b может рассматриваться в качестве классификатора. С учетом проведенных исследований были рассчитаны основные показатели диагностической значимости такого анализа: чувствительность — 0,9, специфичность — 0,54, прогностическая ценность положительного результата (positive predictive value, PPV) — 0,78, прогностическая ценность отрицательного результата (negative predictive value, NPV) — 0,75. Специфичность диагностического метода может быть повышена путем введения дополнительных критериев — показателей экспрессии других маркерных микроРНК. Нами разработан алгоритм интерпретации данных анализа 4 микроРНК: 2 онкогенных (микроРНК-21, микроРНК-200a) и 2 онкосупрессорных (микроРНК-125, микроРНК-205). Расчет уровня экспрессии проводили относительно малой яРНК U6. При этом значение ΔCt микроРНК-125b < 1 считали основным диагностическим критерием и оценивали в 3 балла, значения ΔCt микроРНК-205 $< 3,5$; ΔCt микроРНК-21 > 20 и ΔCt микроРНК-200a $> 0,035$ считали дополнительными критериями и оценивали в 1 балл. Диагноз РМЖ устанавливали в том случае, если результаты ПЦР-анализа удовлетворяли основному и одному из трех дополнительных критериев, т. е. сумма баллов составляла ≥ 4 . Согласно такому алгоритму мы оптимизировали диагностические показатели метода: чувствительность — 0,88, специфичность — 0,61, PPV — 0,8, NPV — 0,74. На рис. 3 представлен пример анализа 3 образцов (№ 8, 14 и 61). Цитологическая диагностика первых 2 не вызвала затруднений, и результаты последующего анализа микроРНК подтвердили диагноз, установленный цитологами. Цитологическая картина

Таблица 1. МикроРНК, включенные в исследование, и результаты сравнительного анализа их экспрессии в смывах цитологических препаратов злокачественных (РМЖ) и доброкачественных (фиброаденома) образований

микроРНК	Ссылка	Характер и уровень изменения экспрессии микроРНК
микроРНК-21	[20]	↑: 2,5 (***)
микроРНК-221	[21]	↓: 0,5 (**)
микроРНК-222	[22]	1
микроРНК-155	[23]	↑: 1,2 (ns)
микроРНК-20a	[24]	↑: 1,8 (ns)
микроРНК-146b	[17]	↑: 1,2 (ns)
микроРНК-200a	[25]	↑: 2,2 (***)
микроРНК-205	[26]	↓: 0,4 (***)
микроРНК-125b	[18]	↓: 0,002 (***)

Примечание. Информация по каждой микроРНК включает характер изменения уровня экспрессии в клетках РМЖ относительно клеток фиброаденомы (↑ — повышение, ↓ — понижение); порядок изменения и статистическую значимость, определенную по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*); $p < 0,05$ (**); $p < 0,005$ (***) ; $p < 0,0005$ (****); ns — наблюдаемые изменения не являются статистически значимыми.

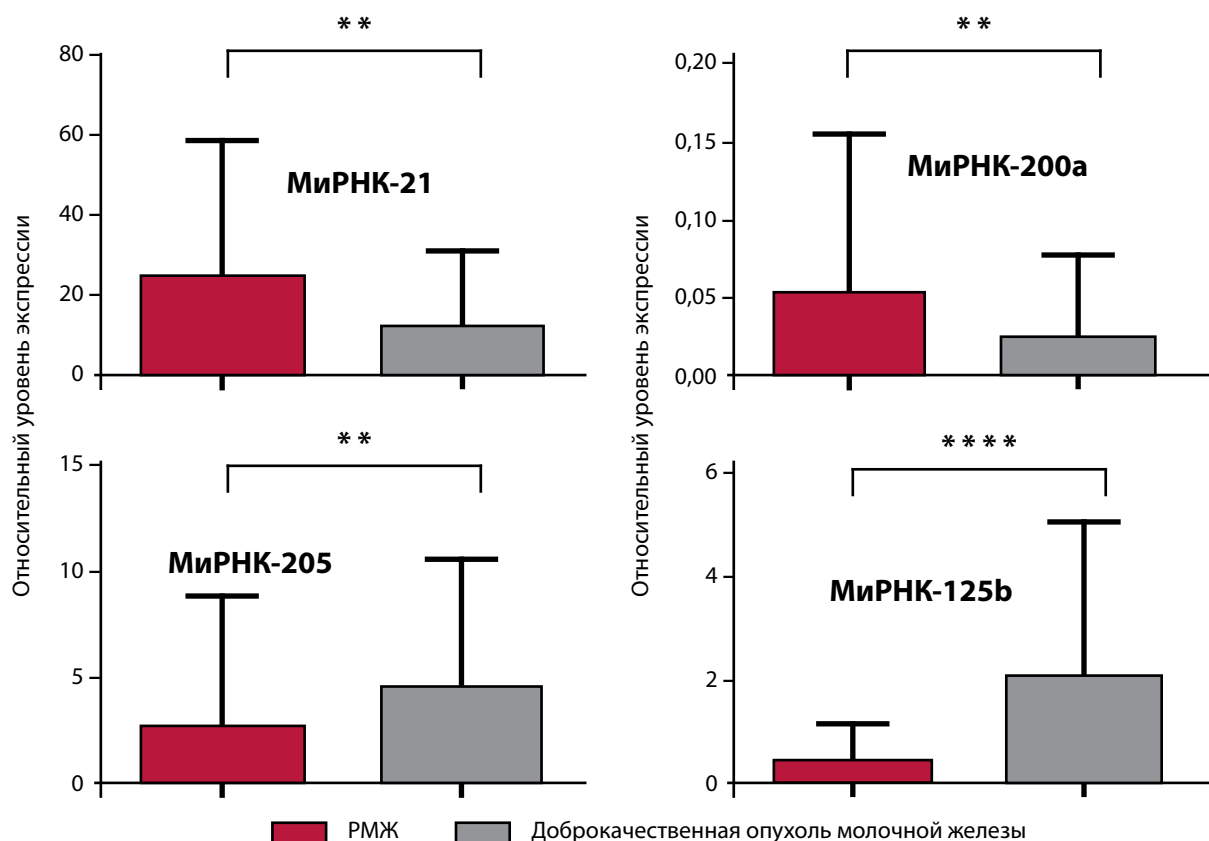


Рис. 1. Различия уровней экспрессии миРНК (медиана; 0,75 квантиль), оцененные в материале цитологических препаратов РМЖ и доброкачественных опухолей (фиброаденома). Результаты рассчитаны относительно уровня экспрессии яРНК U6 ($2^{(Ct\ U6 - Ct\ miR\ of\ interest)}$); стандартные отклонения получены для 51 образца РМЖ и 29 образцов фиброаденомы; статистическая значимость определена по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,05$ (**); $p < 0,0005$ (****)

3-го препарата не была характерна для фиброаденомы, и установление диагноза в данном клиническом случае являлось нетривиальной задачей. Анализ 4 миРНК в материале препарата и оценка результатов с помощью предложенного алгоритма позволили определить природу образования и подтвердить диагноз фиброаденомы.

Корреляции профиля экспрессии микроРНК, определенного в материале цитологического мазка, с клинически значимыми характеристиками РМЖ. Анализ профиля экспрессии миРНК в материале цитологического мазка может быть использован не только для уточнения диагноза и оптимизации процесса диагностики. Особый интерес представляет возможность получения дополнительной информации, источником которой в настоящее время являются данные гистологического или молекулярно-генетического исследования, что требует проведения как минимум трепан-биопсии. Для оценки такой возможности был проведен анализ полученных результатов (профиль экспрессии 9 миРНК в 51 образце РМЖ) в контексте имеющихся данных гистологических исследований материала трепан-биопсий или операционного материала. Результаты анализа представлены в табл. 2 и на рис. 4. Так, уровни экспрессии миРНК-221 и миРНК-146b статистически

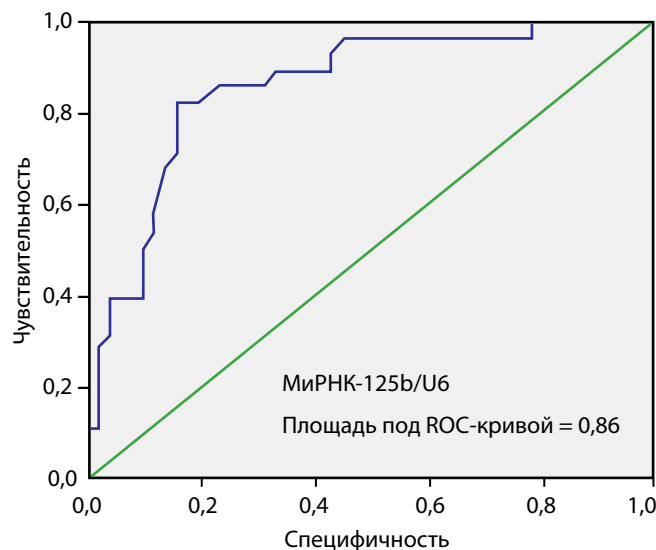
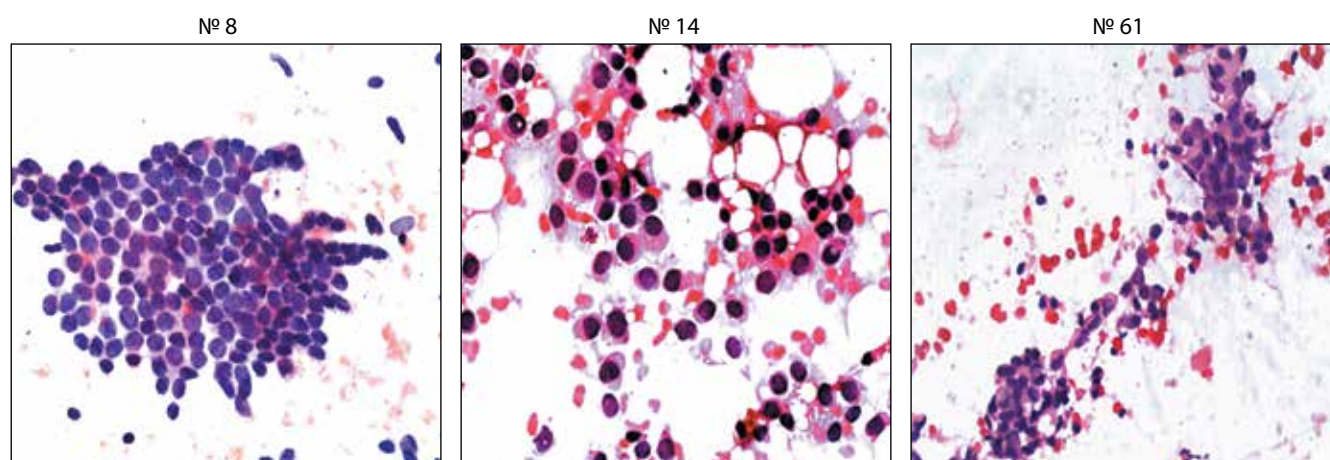


Рис. 2. Оценка диагностической значимости анализа миРНК-125b в материале цитологических препаратов с помощью построения ROC-кривой

значимо повышаются при увеличении значения гистологического критерия G, т. е. при снижении степени дифференцировки опухоли. Повышение уровня экспрессии маркера пролиферативной активности — ядерного антигена Ki-67 — коррелирует со снижением



Номер образца	Результат анализа, баллы				Сумма баллов	Диагноз
	миРНК-125b, $\Delta Ct < 1$ (3 балла)	миРНК-205, $\Delta Ct < 3,5$ (1 балл)	миРНК-21, $\Delta Ct > 20$ (1 балл)	миРНК-200a, $\Delta Ct > 0,035$ (1 балл)		
8	0	1	0	0	1	Фиброаденома
14	3	1	1	1	6	РМЖ
61	3	0	0	0	3	Фиброаденома

Рис. 3. Примеры использования анализа 4 миРНК для уточнения цитологического диагноза 3 образцов

Таблица 2. Корреляция экспрессионных изменений миРНК и клинически значимых характеристик РМЖ

Критерий	Группа сравнения (А/В)	миРНК с различными уровнями экспрессии в сравниваемых группах
Степень дифференцировки опухоли	G ₃ /G ₁₋₂	миРНК-222 ↑: 3,66 (*) миР-146b ↑: 5,11 (***)
Поражение регионарных лимфатических узлов	TxN1–3M0/ TxN0M0	миРНК-21 ↑: 1,55 (ns) миРНК-155 ↑: 1,53 (ns) миРНК-200a ↑: 2,65 (ns)
Снижение экспрессии рецепторов эстрогена	ER < 8/ER8	миРНК-21 ↓: 0,53 (ns) миРНК-221 ↑: 3,41 (ns) миРНК-146b ↑: 3,85 (*)
Экспрессия HER2/neu	HER2 (+)/ HER2 (–)	миРНК-21 ↑: 1,6 (ns) миРНК-205 ↑: 1,9 (ns) миРНК-200a ↓: 0,56 (ns)
Пролиферативный потенциал	Ki-67 > 50/ Ki-67 < 50	миРНК-20a ↑: 0,45 (ns) миРНК-125b ↓: 0,52 (*)
Трижды негативный фенотип	TNBC/luminal	миРНК-222 ↑: 2,32 (*) миРНК-155 ↑: 9,03 (*) миРНК-20a ↑: 4,41 (*)

Примечание. Информация по каждой миРНК включает название, характер (↑ – повышение, ↓ – понижение) и порядок изменения уровня экспрессии при сравнении групп А и В; статистическая значимость, определенная по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*); $p < 0,05$ (**); $p < 0,005$ (***) ns – наблюдаемые изменения не являются статистически значимыми.

уровней экспрессии миРНК-20a и миРНК-125b, хотя наблюдаемые изменения не были статистически значимыми. Рецепторный статус опухоли, определяемый путем иммуногистохимического исследования биопсийного или операционного материала и крайне важный для выбора терапии, также характеризуется специфическими изменениями профиля экспрессии миРНК. Снижение уровня экспрессии рецепторов эстрогенов сопровождается снижением экспрессии миРНК-21 и повышением экспрессии миРНК-221 и миРНК-146b. Экспрессия клетками опухоли рецептора эпидермального фактора роста HER2 коррелирует с повышением экспрессии миРНК-21 и миРНК-205 и снижением экспрессии миРНК-200a. Статистически значимая разница уровней экспрессии 3 миРНК (миРНК-222, миРНК-155 и миРНК-20a) обнаружена между группой препаратов опухолей с TNBC и люминальным (luminal) фенотипами. Кроме того, выявлено, что повышение экспрессии миРНК-21, миРНК-155 и миРНК-200a может указывать на вероятность метастатического поражения регионарных лимфатических узлов.

В целом полученные данные пока недостаточны для формирования четких диагностических алгоритмов, но отчетливо демонстрируют возможность получения клинически значимой информации из материала цитологического мазка путем анализа профиля миРНК.

Обсуждение

В представленной работе описан метод выделения и анализа миРНК из материала цитологических пре-

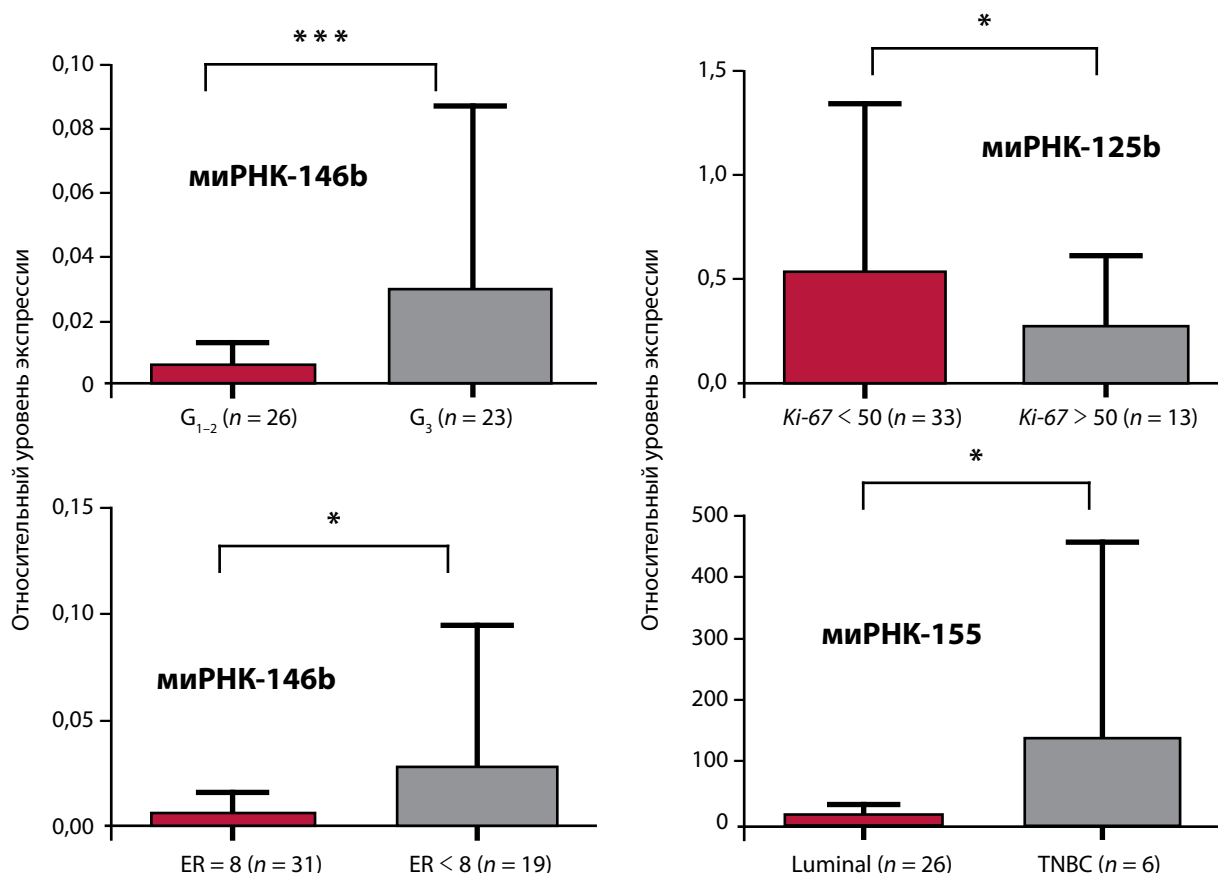


Рис. 4. Примеры корреляций изменений уровней экспрессии миРНК (медиана; 0,75 квантиль) и клинически значимых характеристик РМЖ. Результаты рассчитаны относительно уровня экспрессии яРНК U6 (2 (Ct U6 – Ct miR of interest)); показаны стандартные отклонения для сравниваемых групп, численность которых представлена в скобках; статистическая значимость определена по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*); $p < 0,005$ (***)

паратов и обоснована целесообразность использования этого способа в ходе дифференциальной диагностики опухолей молочной железы. Это пилотное исследование показывает возможность применения метода как в рутинной клинической практике, так и в целях ретроспективного анализа.

В последние несколько лет опубликованы тысячи научных работ о роли миРНК в развитии онкологических заболеваний, включая РМЖ. Теоретические знания постепенно реализуются в создании новых методов диагностики и лечения. В частности, на мировом рынке лабораторных услуг появилось несколько компаний, предлагающих тест-системы на основе анализа миРНК в биологических жидкостях или в опухолевой ткани в целях уточнения/верификации диагноза (например, Exosome Diagnostics, Rosetta Genomics). Однако внедрение таких тест-систем в широкую клиническую практику требует решения 2 задач: оптимизации методов анализа и разработки алгоритмов интерпретации полученных данных. Результаты нашей работы показали необходимость дополнительных исследований по обоим направлениям. В частности, методы выделения РНК для последующего анализа миРНК должны обеспечивать сохранность коротких молекул, что достигается использованием специфических сорбентов и оптимизацией композиций буфе-

ров и растворов, используемых при выделении. Нетривиальной задачей является количественный анализ миРНК в образцах. Наиболее широко используется метод ОТ и последующей ПЦР, но получение достоверных и воспроизводимых результатов с помощью ОТ-ПЦР сопряжено с рядом сложностей. Во-первых, короткая последовательность (20–22 нуклеотидов) миРНК затрудняет подбор праймеров и проб. Во-вторых, существование «родственных», частично гомологичных молекул снижает специфичность анализа. В-третьих, в образце могут содержаться молекулы одного типа миРНК, находящиеся на разных этапах биогенеза и имеющие фрагменты аналогичных последовательностей, но различную функциональную значимость. Все эти особенности влияют на эффективность ОТ-ПЦР и получаемые результаты.

Не менее важной задачей является разработка алгоритмов интерпретации полученных данных. Дизайн научных исследований обычно предполагает сравнение групп образцов/пациентов, что дает возможность оценить общие тенденции изменения профиля экспрессии миРНК, связанные с определенной патологической особенностью ткани. Но популяционный полиморфизм и индивидуальные особенности каждой опухоли закономерно формируют специфический «персональный» профиль миРНК в каждом клиниче-

ском случае. Можно предположить, что диагностическое значение имеют несколько молекул/десятков молекул миРНК, так называемый «онкомир», по характерному изменению которых можно делать клинически значимые заключения. Наше исследование было ограничено анализом лишь 9 молекул миРНК. Предложенный простой алгоритм интерпретации результатов исследования экспрессии 4 из них позволил добиться относительно высоких показателей диагностической значимости оценки (чувствительность — 0,88; специфичность — 0,61). Есть основания полагать, что расширение списка «маркерных» молекул и более комплексный анализ их «взаимоизменений» может оптимизировать чувствительность и специфичность метода.

Показанные в рамках исследования корреляции экспрессионных изменений миРНК и иммуногистохимических/молекулярно-генетических признаков опухоли имеют особую практическую значимость. При этом полученные данные согласуются с результатами ранее опубликованных исследований. Так, например, показано участие миРНК-146b в регуляции подавления пролиферации клеток РМЖ в ответ на тамоксифен (нестероидный антиэстроген, используемый для лечения гормонозависимых форм РМЖ) [16]. Наблюдаемое повышение экспрессии миРНК-146b может отражать адаптивную реакцию клетки на снижение или функциональную блокаду экспрессии рецепторов эстрогенов.

Прогностическая значимость миРНК-155 в ситуации TNBC была описана в недавней работе итальянских исследователей [10]. В частности, показано, что анализ экспрессии миРНК-155 может быть использован для выделения так называемого «пятикратно» негативного типа РМЖ (ER-/PR-/HER2-/EGFR-/CK5-), что может иметь непосредственное клиническое значение. Корреляция между экспрессионными изменениями миРНК-20a и формированием TNBC, выявленная в нашем исследовании, также подтверждается результатами других работ [17]. При этом неко-

торые полученные результаты требуют дополнительных исследований. Например, в ряде работ было показано, что семейство молекул миРНК-200 ингибирует миграционную активность клеток РМЖ [18] и снижение экспрессии этих молекул ассоциировано с развитием метастазов в регионарных лимфатических узлах [19]. Наши результаты противоречат этим наблюдениям, что требует более детального исследования роли этих молекул в процессе метастатической диссеминации и дополнительной валидации полученных данных.

Выводы

Материал ТАПБ, использованный для традиционного цитологического исследования, пригоден для изоляции РНК и анализа профиля экспрессии миРНК методом ОТ-ПЦР.

Анализ экспрессии 4 миРНК (миРНК-125b, миРНК-21, миРНК-205 и миРНК-200a) позволяет отличить биопсийный материал РМЖ от материала доброкачественных образований молочной железы. При этом чувствительность анализа составляет 0,88, специфичность — 0,61, PPV — 0,8, NPV — 0,74.

Особенности профиля экспрессии миРНК в материале цитологического мазка коррелируют с гистологическими (G), иммуногистохимическими (ER, HER2, Ki-67), молекулярно-генетическими (luminal, TNBC) и клиническими (наличие регионарных метастазов) характеристиками.

Дополнительные исследования необходимы для оценки диагностической значимости наблюдаемых корреляций и разработки соответствующих диагностических алгоритмов.

В целом представленное исследование показало высокую перспективность дальнейшей работы в целях создания и внедрения в клиническую практику диагностических и прогностических методов, основанных на анализе миРНК в различных образцах, включая материал ТАПБ в рамках диагностики РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2012 (morbidity and fatality). Moscow: P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Ministry of Health of Russia, 2014. (In Russ.).]
- Stolier A., Skinner J., Levine E.A. A prospective study of seeding of the skin after core biopsy of the breast. *Am J Surg* 2000;180(2):104–7.
- Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014;9:287–314.
- Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veriaskina Iu.A. et al. MicroRNA, evolution and cancer. *Tsitologiya* 2013;55(3):159–64.
- Takahashi R.U., Miyazaki H., Ochiya T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers* 2015;7(2):598–616.
- Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* 2015;5(10):1122–43.
- Graveel C.R., Calderone H.M., Westerhuis J.J. et al. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer* 2015;7:59–79.
- Bhattacharyya M., Nath J., Bandyopadhyay S. MicroRNA signatures highlight new breast cancer subtypes. *Gene* 2015;556(2):192–8.
- Веряскина Ю.А., Титов С.Е., Родионов В.В. др. Экспрессия микроРНК в молекулярно-генетических подтипах

- рака молочной железы. Современные проблемы науки и образования 2015;5. [Véryaskina Yu.A., Titov S.E., Rodionov V.V. et al. MicroRNA experssion in molecular & genetic subtype of the mammary gland cancer. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Science and Education Problems 2015;5. (In Russ.)].
10. Gasparini P., Cascione L., Fassan M. et al. MicroRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget* 2014;5(5):1174–84.
11. Kolacinska A., Morawiec J., Fendler W. et al. Association of microRNAs and pathologic response to preoperative chemotherapy in triple negative breast cancer: preliminary report. *Mol Biol Rep* 2014;41(5):2851–7.
12. Ouyang M., Li Y., Ye S. et al. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PloS One* 2014;9(5):e96228.
13. Harquail J., Benzina S., Robichaud G.A. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer Biomark* 2012;11(6):269–80.
14. Tanic M., Yanowski K., Andres E. et al. MiRNA expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) hereditary breast tumors. *Genom Data* 2015;3:75–9.
15. Kolacinska A., Morawiec J., Pawlowska Z. et al. Association of microRNA-93, 190, 200b and receptor status in core biopsies from stage III breast cancer patients. *DNA Cell Biol* 2014;33(9):624–9.
16. Phuong N.T., Kim S.K., Im J.H. et al. Induction of methionine adenosyltransferase 2A in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncotarget* 2015.
17. Calvano Filho C.M., Calvano-Mendes D.C., Carvalho K.C. et al. Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. *Tumour Biology* 2014;35(8):7733–41.
18. Xu F., He H., Huang W. et al. Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis. *Clin Transl Oncol* 2016;18(3):283–8.
19. Tsouko E., Wang J., Frigo D.E. et al. MiR-200a inhibits migration of triple-negative breast cancer cells through direct repression of the *EPHA2* oncogene. *Carcinogenesis* 2015;36(9):1051–60.
20. Usmani A., Shoro A.A., Memon Z. et al. Diagnostic, prognostic and predictive value of MicroRNA-21 in breast cancer patients, their daughters and healthy individuals. *Am J Cancer Res* 2015;5(8):2484–90.
21. Eissa S., Matboli M., Sharawy A., El-Sharkawi F. Prognostic and biological significance of microRNA-221 in breast cancer. *Gene* 2015;574(1):163–7.
22. Li Y., Liang C., Ma H. et al. MiR-221/222 promotes S-phase entry and cellular migration in control of basal-like breast cancer. *Molecules* 2014;19(6):7122–37.
23. Yu D.D., Lv M.M., Chen W.X. et al. Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer. *Tumour Biol* 2015;36(3):1395–401.
24. Zhang H., Fan Q. MicroRNA-205 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer by regulating AMOT expression. *Oncol Rep* 2015;34(4):2163–70.
25. Vilquin P., Donini C.F., Villedieu M. et al. MicroRNA-125b upregulation confers aromatase inhibitor resistance and is a novel marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2015;17:13.
26. Hurst D.R., Edmonds M.D., Scott G.K. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009;69(4):1279–83.

Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в различных типах опухолей человека

А.В. Суховских^{1,2}, Э.В. Григорьева^{1,2}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»; Россия, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Контакты: Анастасия Владимировна Суховских anastasia-suhovskih@mail.ru

Введение. Протеогликаны (ПГ) — белково-углеводные молекулы, участвующие в межклеточных взаимодействиях и поддержании структуры внеклеточного матрикса. Экспрессия ПГ и их состав значительно изменяются при злокачественной трансформации клеток и тканей.

Цель работы — изучить тканеспецифичность экспрессии основных ПГ (глипикана-1, перлекана, синдекана-1, агрекана, версикана, ХСПГ4/NG2, бревикана, декорина и люмикана) в нормальных (фибробласты, эпителиальные клетки предстательной железы PNT2) и опухолевых клеточных линиях человека (рак предстательной железы, молочной железы, легкого, мозга, почки) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Было показано, что фибробласты наиболее активно экспрессируют ПГ, а клетки PNT2 характеризуются более низкой (в 5–6 раз) экспрессией ограниченного набора ПГ. Опухолевые клеточные линии отличаются по общей транскрипционной активности ПГ (до 10 раз) и паттерну экспрессируемых ПГ, обладая при этом тканеспецифичными признаками (например, экспрессия синдекана-1 более характерна для опухолей предстательной железы, а экспрессия перлекана — для рака легкого).

Заключение. Вариабельность паттернов экспрессии ПГ в клеточных линиях одного типа опухоли может вносить вклад во внутриопухолевую гетерогенность и служить потенциальным биомаркером для персонализированной диагностики опухолей.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, микроокружение опухоли, протеогликаны, паттерн экспрессии, тканеспецифичность, рак легкого, рак молочной железы, рак предстательной железы

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-53-60

Tissue-specificity of proteoglycans expression in different cancers

A. V. Suhovskih^{1,2}, E. V. Grigor'eva^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics; 2/12 Timakova St., Novosibirsk, 630117, Russia;

²Novosibirsk State University; 2 Pirogova St., Novosibirsk, 630090, Russia

Background. Proteoglycans (PGs) are complex glycosylated molecules playing an important role in cell-cell and cell-matrix interactions and signaling. Expression of PGs and their expression pattern change considerably during malignant transformation of mammalian cells and tissues.

Objective. The aim of our work was to investigate tissue-specificity of main PGs expression (glypican-1, perlecan, syndecan-1, aggrecan, CSPG4/NG2, brevican, decorin, lumican) in normal cells (fibroblasts and normal epithelial prostate cells PNT2) and in different human cancer cell lines (prostate, breast, lung, brain, kidney). Expression patterns of main PGs were determined in these cells using reverse transcription polymerase chain reaction analysis and immunocytochemical staining.

Results. It was shown that fibroblasts actively expressed PGs, and PNT2 cells had lower (5–6-fold) expression levels of a limited set of PG. In different cancer cell lines, overall transcriptional activities of PGs varied up to 10-fold, although their expression patterns had tissue-specific properties (for example, expression of syndecan-1 is more specific for prostate cancer cells, while perlecan is typical for lung cancer cell lines).

Conclusions. Along with this, variability of the PG expression patterns in cell lines of the same tissue of origin was shown, suggesting a possible contribution of the variable PGs expression to intratumoural heterogeneity of cancer cells and their potential as perspective biomarker (s) for personalised cancer diagnostics.

Key words: extracellular matrix, tumour microenvironment, proteoglycan, expression pattern, tissue-specificity, lung cancer, breast cancer, prostate cancer

Введение

Внеклеточный матрикс (ВКМ) — основной компонент микроокружения опухолевых клеток, который отвечает за развитие злокачественного процесса и процесс метастазирования. Одним из основных компо-

нентов ВКМ являются протеогликаны (ПГ) — сложные белково-углеводные молекулы, состоящие из корового белка и присоединенных к нему углеводных цепей гликозаминогликанов. ПГ локализуются в основном на клеточной поверхности и в ВКМ, участвуют в под-

держании межклеточных контактов, взаимодействии с различными факторами роста и передаче сигнальной информации [1, 2]. Эти молекулы были идентифицированы много лет назад и охарактеризованы как тканеспецифичные компоненты всех живых клеток и тканей [3]. Так, синдеканы и глипиканы, являющиеся ПГ клеточной поверхности, выступают в качестве корецепторов для факторов роста и соответствующих тирозинкиназных рецепторов, взаимодействуют с белками цитоскелета [4]. Синдекан-1 экспрессируется эпителиальными клетками [4] и вовлечен в большое количество биологических процессов, включая дифференцировку, клеточную адгезию, организацию цитоскелета, клеточную миграцию, воспаление и ангиогенез [5, 6]. Декорин (дерматансульфат ПГ), присутствующий преимущественно в ВКМ, вступает в контакт с различными типами коллагенов, а также играет роль в регуляции клеточной пролиферации, взаимодействуя с клетками непосредственно или через факторы роста [7].

В литературе достоверно показано участие различных ПГ в процессах канцерогенеза [2, 8]. Увеличение экспрессии трансмембранного гепарансульфата ПГ синдекана-1 является негативным прогностическим фактором при раке молочной железы [9], поджелудочной железы [10], желудка [11], эндометрия [12] и яичников [13]. Уровень его экспрессии в опухолях молочной железы коррелирует с плохим ответом на химиотерапию [9], что может быть связано со стимуляцией синдеканом-1 опухолевых стволовых клеток [14]. Также показано, что синдекан-1 вовлечен в стимуляцию опухолевых стволовых клеток в колоректальной карциноме [15] и в их стабилизацию при раке предстательной железы [16], когда высокая экспрессия синдекана-1 является признанной чертой агрессивного развития опухоли [17]. Увеличение экспрессии синдекана в глиомах также связано с плохим прогнозом течения заболевания [18].

Декорин (дерматансульфат ПГ) принадлежит к семейству малых белков, богатых лейцином (SLRP), синтезируется в основном фибробластами стромы и депонируется в ВКМ, где связывается с коллагеном I типа. Как функциональный компонент ВКМ, декорин вовлечен в ряд физиологических (клеточная пролиферация, дифференцировка и заживление ран) и патологических процессов (канцерогенез) [19].

Декорин является мощным ингибитором пролиферации, связывая различные факторы роста, включая трансформирующий фактор роста β -1,2 (TGF β -1,2) и миостатин, напрямую блокирует некоторые рецепторы, принадлежащие семейству тирозинкиназ, например рецептор эпидермального фактора роста-1 (EGFR), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF1R), фактор роста гепатоцитов (HGF) [20]. Декорин также участвует в контроле процессов воспаления путем связывания с toll-подобными рецепторами 2-го и 4-го типов [21].

Люмикан (кератансульфат ПГ) принадлежит к семейству малых ПГ, богатых лейцином. Люмикан игра-

ет ключевую роль в организации ВКМ и участвует в регуляции многих биологических функций: вовлечен в регуляцию клеточного роста, апоптоз, миграцию, инвазию клеток, ангиогенез [22]. Имеются двойственные данные о про- и анти-онкогенной роли люмикана. В некоторых работах показано, что повышенная экспрессия люмикана коррелирует с плохим прогнозом при раке поджелудочной железы [23] и плоскоклеточном раке легкого [24], а в опухолях молочной железы экспрессия люмикана в строме снижена, что ассоциировано с более поздней стадией заболевания [25].

В большинстве работ описаны изменения экспрессии различных индивидуальных ПГ в опухолевых тканях, однако одновременное определение набора ПГ и паттерна их экспрессии в конкретном типе клеток/ткани остается малоизученным. Специфические наборы ПГ идентифицированы в опухолях молочной железы [25], предстательной железы [26], прямой кишки [27], гортани [28], плевры [29] и в образцах нейроэндокринных опухолей человека [30]. Вместе с тем косвенные данные указывают на возможность как типовой, так внутриопухолевой гетерогенности экспрессии ПГ, и этот вопрос может быть тесно связан с морфологическими и функциональными характеристиками опухолевых клеток.

Цель данной работы — определение паттерна экспрессии ПГ в различных линиях нормальных и опухолевых клеток человека в культуре *in vitro* с использованием единых методов исследования и проведение сравнительного анализа, который позволит проверить гипотезу о гетерогенной и/или тканеспецифичной экспрессии ПГ в различных опухолях.

Экспериментальная часть

Клеточные культуры. Культура нормальных эпителиальных клеток предстательной железы PNT2 была получена из Европейской коллекции клеточных культур (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC). Иммуortalизованные фибробласты человека (TERT-immortalized fibroblasts) и культуры клеток рака предстательной железы (LNCaP, PC3, DU145), молочной железы (MCF7), легкого (U2020, A549, H157, H647), почки (KRCY), головного мозга (U87) человека получены в Каролинском медицинском институте г. Стокгольма (Швеция). Фибробласты, PNT2, LNCaP, PC3, DU145 культивировали в среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute), все остальные клеточные линии — в среде IMDM (Iscove modified Dulbecco's medium), содержащей 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 % фетальной бычьей сыворотки (fetal bovine serum — FBS), в 5 % CO₂ атмосфере при +37 °C. Для анализа клетки снимали с поверхности с использованием смеси трипсина с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) по стандартному протоколу, фиксировали в RNA-later и хранили при –20 °C.

Анализ экспрессии генов методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрип-

цией. Суммарную клеточную РНК выделяли с помощью набора PureLink Total RNA Purification System (Invitrogen, США), 1 мкг полученной РНК использовали в реакции обратной транскрипции (ОТ) для синтеза кДНК (First Strand cDNA Synthesis kit, Fermentas, США). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия) в конечном объеме 10 мкл (1 мкл кДНК; ПЦР-буфер — 10 мМ Трис-НСl; 1,7 мМ MgCl₂; 50 мМ KCl; pH 8,3; по 5 пмоль прямого и обратного праймеров; 0,1 ммоль каждого дезоксинуклеозидтрифосфата; 1 ед. активной Taq-ДНК-полимеразы). Амплификацию проводили при следующих условиях: 5 мин при температуре +95 °С, 30 с — при +95 °С, 30 с при температуре, индивидуальной для каждой пары праймеров, 60 с — при +72 °С, 10 мин — при +72 °С. Температура отжига и количество циклов для каждой пары праймеров указаны в таблице.

Горизонтальный электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле. Анализ продуктов ПЦР выполняли методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле в трис-боратном электродном (Tris/

Borate/EDTA, TBE) буфере (89 мМ Трис, 0,05 М ЭДТА, 89 мМ борная кислота, pH — 8,0) при напряженности электрического поля 6–8 В/см на протяжении 20–30 мин. Перед нанесением на гель к пробам добавляли буфер для нанесения (50,0 % глицерин, 0,1 % бромфеноловый синий, 0,1 % ксиленианол). Гель окрашивали в буфере TBE с концентрацией бромистого этидия 50 мкг/мл. Сканирование геля проводили в ультрафиолетовом свете с помощью видеосистемы Viber Lourmat ECX-F20M.

Иммуноцитохимический анализ. Клетки фиксировали в 4 % параформальдегиде (10 мин при комнатной температуре), обрабатывали 0,1 % тритон X-100 (10 мин при комнатной температуре). Блокировку проводили 3 % FBS в PBS-T (PBS, 0,05 % Tween 20) на протяжении 30 мин при комнатной температуре, инкубировали с первичными антителами (в разведениях для анти-синдекан-1 (Abcam, Великобритания), анти-глипикан-1 (Abcam, Великобритания) — 1:150) в PBS-T, содержащем 1 % FBS, в течение 1 ч при комнатной температуре и затем с вторичными антителами anti-mouse, конъюгированными с FITS (Vector, США) (в разведе-

Последовательности праймеров и условия ПЦР

Праймер	Последовательность в направлении 5'–3'	Размер продукта ПЦР, п. н.	Условия ПЦР	
			температура отжига, °С	количество циклов
Глипикан-1 (прямой)	5'-GAGCTGCGGCGAGGTCCG-3'	648	55	33
Глипикан-1 (обратный)	5'-CTGGTCTACTGTGCTCACTGCC-3'			
Перлекан (прямой)	5'-TCCCTGGACACAGATGGC-3'	314	55	35
Перлекан (обратный)	5'-ACCCATGCAGAAACAGGG-3'			
Синдекан-1 (прямой)	5'-GCCCCCTGAAGATCAAGATGGC-3'	790	61	30
Синдекан-1 (обратный)	5'-CCTCCTGTTTGGTGGGCTTCTG-3'			
Аггрекан (прямой)	5'-CTTCTACCGCCCCACTGGCC-3'	400	63	33
Аггрекан (обратный)	5'-GCCAGCCGGCGTCACACTG-3'			
Версикан (прямой)	5'-GGCCAGCCCCCTGTTGTAGA-3'	308	63	33
Версикан (обратный)	5'-AGGGATCAGCGCCTCGACTC-3'			
ХСПГ4/NG2 (прямой)	5'-AGCCCTTTTGGGAGGCCCATG-3'	758	61	30
ХСПГ4/NG2 (обратный)	5'-GAAGATGCCTGCCACGCTGC-3'			
Бревикан (прямой)	5'-GCCCTCACCATCCCTTGCCA-3'	476	61	30
Бревикан (обратный)	5'-TCCGACAGCCAGCCAGCATC-3'			
Декорин (прямой)	5'-GGCCACTATCATCCTCCTTCTGC-3'	1031	59	25
Декорин (обратный)	5'-ATGGCAGAGCGCACGTAGACAC-3'			
Люмикан (прямой)	5'-CTCTCTCCTGGCATTGATTGGTGG-3'	720	61	30
Люмикан (обратный)	5'-GACAGATCCAGCTCAACCAGGG-3'			
Ген GAPDH (прямой)	5'-GGGCGCCTGGTCACCAG-3'	350	59	22
Ген GAPDH (обратный)	5'-AACATGGGGGCATCAGCAGAG-3'			

нии 1:1000), и anti-rabbit, конъюгированными с Texas Red (Vector, США) (в разведении 1:2000) в буфере PBS-T, содержащем 1 % FBS, в течение 1 ч при комнатной температуре. На срезы наносили покровную среду Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (Invitrogen, США). Препараты анализировали на микроскопе Dmre (Leica, Германия).

Статистический анализ. Денситометрию проводили с помощью компьютерной программы Gel Analysis (Россия). Относительный уровень мРНК генов оценивали в относительных единицах как отношение интенсивности специфической полосы гена к интенсивности полосы гена «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). Данные по экспрессии генов определяли как среднее значение с расчетом среднестатистического отклонения. Все расчеты выполняли с использованием программного обеспечения Origin 8.5 (OriginLab, США).

Результаты

На первом этапе была поставлена задача изучить экспрессию 9 основных ПГ ВКМ и клеточной поверхности: глипикана-1, перлекана, синдекана-1, агрекана, версикана, ХСПГ4/NG2, бревикана, декорина и люмикана на уровне мРНК в фибробластах, нормальных эпителиальных клетках предстательной железы человека (PNT2) и на различных опухолевых клеточных линиях человека (клеточные линии рака предстательной железы LNCaP, PC3, DU145, рака легкого U2020, A549, H647, H157, рака молочной железы MCF7, рака почки KRCY, глиобластомы U87). Для этого бы-

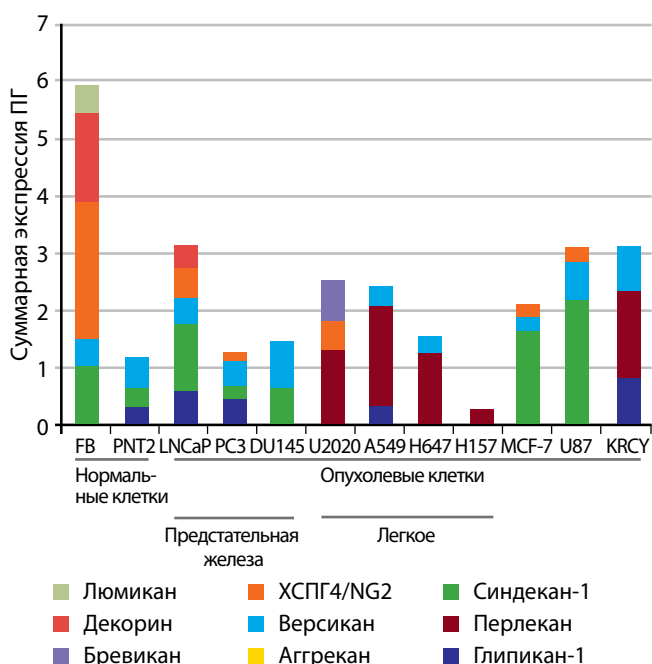


Рис. 1. Паттерн транскрипционной активности генов ПГ в различных клеточных линиях. Анализ ОТ-ПЦР, интенсивность амплифицированного ДНК-фрагмента для каждого гена по отношению к интенсивности *GAPDH*. В каждой колонке виден вклад экспрессии индивидуальных ПГ в ее общий уровень

ла проведена полуколичественная оценка уровня экспрессии исследуемых генов методом мультиплексной ОТ-ПЦР; контрольный ген — *GAPDH* (рис. 1).

В качестве основного параметра для проведения сравнительного анализа использовали общий уровень транскрипционной активности генов, кодирующих ключевые ПГ, полученный суммированием уровней экспрессии индивидуальных ПГ в каждой конкретной клеточной линии. На рис. 2 каждой отдельной колонке соответствует общий уровень транскрипционной активности ПГ-кодирующих генов.

Согласно полученным данным нормальные клетки различного морфологического происхождения значительно отличаются между собой по набору экспрессируемых ПГ и общему уровню их экспрессии. Фибробласты, как основные клеточные компоненты стромы, синтезируют широкий набор ПГ, основными из которых являются синдекан-1, ХСПГ4/NG2, декорин, люмикан. Нормальные PNT2 экспрессируют глипикан-1, синдекан-1 и версикан. Разница в общем уровне экспрессии ПГ между фибробластами и нормальными PNT2 составляет 5–6 раз.

Опухолевые клеточные линии также отличаются между собой по общей транскрипционной активности ПГ (до 10 раз) и по набору экспрессируемых ПГ. Каждая опухолевая клеточная линия имеет свой паттерн и специфический суммарный уровень транскрипционной активности ПГ-кодирующих генов, однако для различных видов опухолей можно выявить и общие особенности паттернов экспрессии ПГ. Так, например, во всех клеточных линиях рака предстательной железы экспрессируются 2 ПГ: синдекан-1 и версикан. Также в клетках LNCaP экспрессируются глипикан-1, ХСПГ4/NG2 и декорин, в клетках PC3 — глипикан и ХСПГ4/NG2. Во всех клеточных линиях рака легкого экспрессируется перлекан, а также глипикан-1, ХСПГ4/NG2, версикан, бревикан в разных комбинациях в различных клеточных линиях рака легкого.

Таким образом, несмотря на индивидуальные особенности различных клеточных линий, можно сделать вывод о тканеспецифичной экспрессии определенного набора ПГ в разных типах опухолей человека.

При этом вариабельность паттерна экспрессии ПГ в различных линиях опухолевых клеток одинакового морфологического происхождения обусловлена определенными комбинациями уровней экспрессии индивидуальных ПГ (см. рис. 2).

По результатам ОТ-ПЦР можно увидеть, что ни один из ПГ не экспрессируется во всех клеточных линиях. Перлекан экспрессируется на высоком уровне в клеточных линиях рака легкого (см. рис. 2). Экспрессия глипикана-1 характерна как для клеток предстательной железы, так и для клеток рака легкого и рака почки. ХСПГ4/NG2, являющийся типичным для клеток нервной ткани и для стволовых клеток, экспрессируется также в клеточных линиях рака предстательной железы (LNCaP и PC3), рака молочной железы

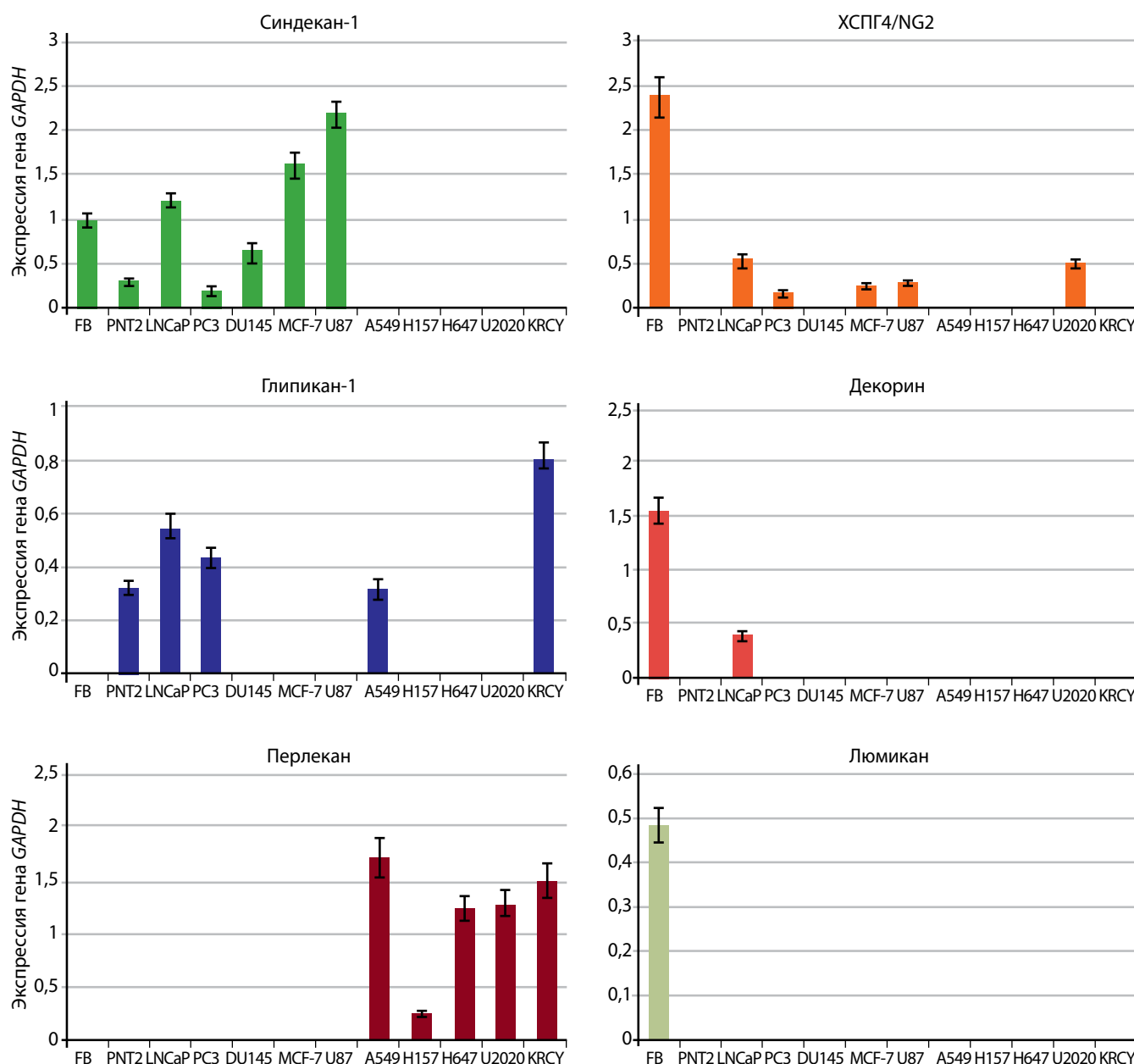


Рис. 2. Экспрессия отдельных ПГ в различных клеточных линиях. Анализ ОТ-ПЦР, интенсивность амплифицированного ДНК-фрагмента для каждого гена по отношению к интенсивности GAPDH

и мелкоклеточного рака легкого (U2020). Декорин экспрессируется в фибробластах и в клеточной линии рака предстательной железы LNCaP, люмикан — только в фибробластах, синдекан-1 — преимущественно в клеточной линии рака мозга (U87) и в клетках предстательной железы (как в нормальных — PNT2, так и в опухолевых — LNCaP, PC3, DU145). Интересно, что уровень экспрессии синдекана-1 значительно варьирует в клеточных линиях рака предстательной железы с различными функциональными характеристиками (LNCaP — гормонозависимая, неметастазирующая, PC3 и DU145 — гормоннезависимые, метастазирующие), что может свидетельствовать о высокой внутриопухолевой гетерогенности клеток по уровню экспрессии этого гена.

Данные иммунофлуоресцентного окрашивания нормальных (PNT2) и опухолевых (LNCaP, PC3, DU145) клеток предстательной железы на синдекан-1 и глипикан-1 подтверждают гетерогенность экспрессии исследуемых молекул на белковом уровне в различных клеточных линиях (рис. 3).

Показано, что синдекан-1 активно экспрессируется в опухолевых клетках предстательной железы LNCaP, PC3 и слабо в DU145 и нормальных PNT2 (см. рис. 3), а глипикан-1 — активно в LNCaP, PC3, PNT2 и слабо в DU145, что согласуется с данными по их экспрессии на уровне мРНК.

Таким образом, различные типы опухолей человека отличаются между собой по набору экспрессируе-

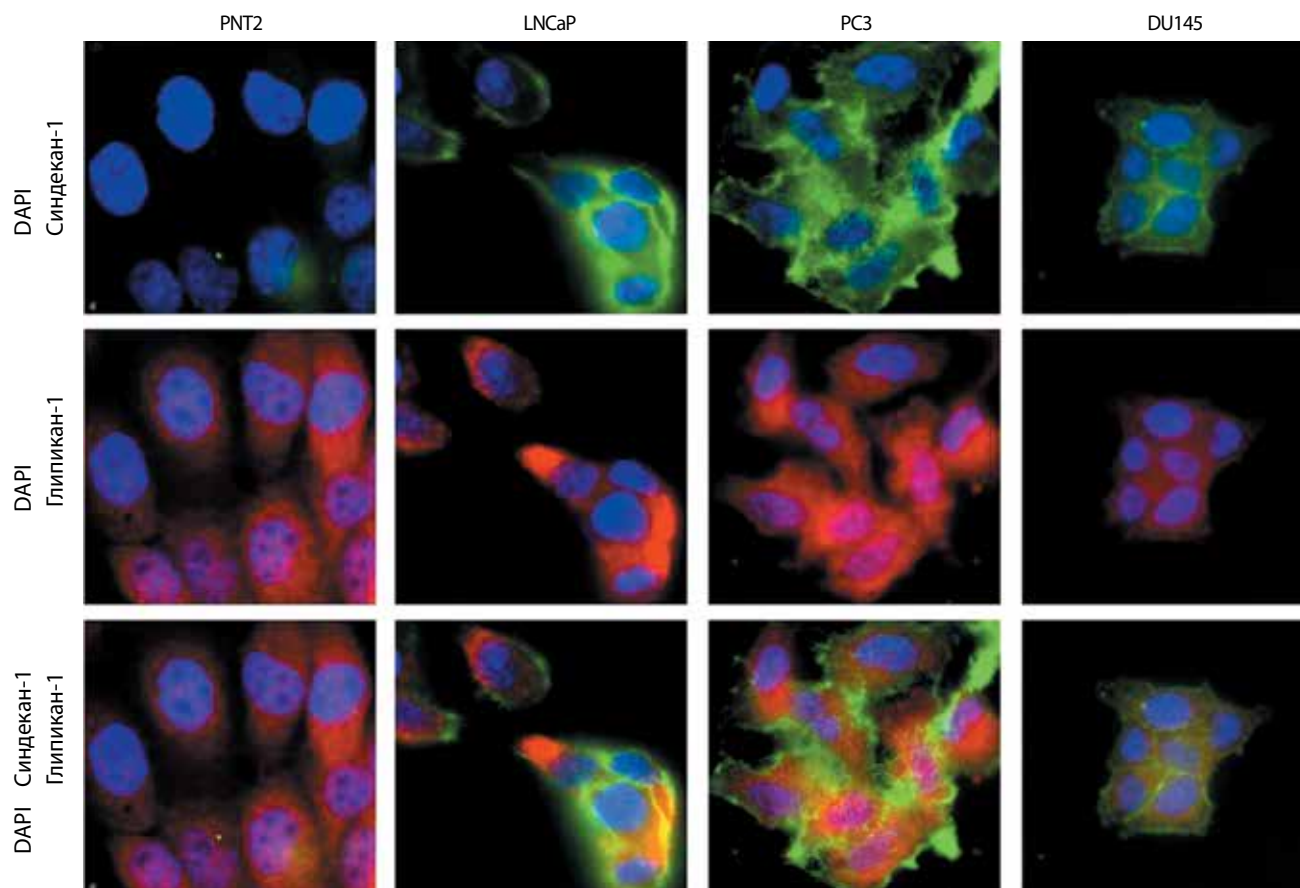


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание синдeкана-1 и глипикана-1 в нормальных эпителиальных клетках предстательной железы (PNT2) и в клеточных линиях рака предстательной железы (LNCaP, PC3, DU145). Верхний ряд — окрашивание клеток на синдeкан-1 (зеленый цвет), средний — на глипикан-1 (красный цвет), нижний — на синдeкан-1 и глипикан-1. Ядра клеток визуализированы DAPI (синий цвет)

мых ПГ и по уровню их транскрипционной активности. Вместе с тем различия в экспрессии ПГ наблюдаются также и между клеточными линиями в пределах одной опухоли (при этом каждая клеточная линия обладает специфичным паттерном экспрессии основных ПГ), что может свидетельствовать о внутриопухолевой гетерогенности клеточного состава опухоли *in vivo* по этому параметру.

Обсуждение

В данной работе впервые проведено одновременное исследование экспрессии основных ПГ (глипикан-1, перлекана, синдeкана-1, агрекана, версикана, ХСПГ4/NG2, бревикана, декорина и люмикана) в фибробластах, нормальных PNT2 и в различных опухолевых клеточных линиях (LNCaP, PC3, DU145, U2020, A549, H647, H157, MCF-7, U87, KRCY) человека. Мы показали, что нормальные PNT2 и фибробласты значительно отличаются по паттерну и уровню экспрессии ПГ. Общий уровень экспрессии ПГ в фибробластах выше, чем в нормальных PNT2 в 5–6 раз. К экспрессируемым в фибробластах ПГ относятся хондроитинсульфат, дерматансульфат и кератансульфат ПГ (ХСПГ4/NG2, декорин и люмикан), которые составляют структурную основу ВКМ, а в нормальных PNT2 домини-

руют гепарансульфат ПГ (синдeкан-1, глипикан-1) — ПГ клеточной поверхности, отвечающие за взаимодействие клетки с ВКМ. Полученные данные хорошо согласуются с положением о том, что основную массу ВКМ в ткани предстательной железы синтезируют фибробласты, основной функцией которых является синтез компонентов ВКМ, в том числе ПГ, а эпителиальные клетки характеризуются более низким уровнем экспрессии специфического набора ПГ.

В опухолевых клетках происходят изменения паттерна и уровня экспрессии ПГ. Это можно видеть на модели рака предстательной железы. В морфологически различных клеточных линиях (LNCaP, PC3, DU145) происходят специфические изменения состава и уровня экспрессии отдельных ПГ, но в целом паттерн экспрессируемых ПГ остается характерным: во всех клеточных линиях экспрессируется синдeкан-1, что говорит о тканеспецифичности экспрессии этого ПГ в данных клеточных линиях.

Состав и паттерн экспрессии ПГ варьируют также в различных клеточных линиях рака легкого (U2020, A549, H647, H157), однако и в этом случае во всех клеточных линиях прослеживаются черты тканеспецифичности, связанные с доминирующей экспрессией перлекана. Ранее паттерн экспрессии ПГ в опухолевых

клетках легкого не был изучен, имеются лишь данные об экспрессии некоторых ПГ (синдекана, глипикана, перлекана и CD44), экспрессия которых была проанализирована в опухолях легких *in vivo* и клеточных линиях рака легкого человека Calu-1, SW 900, NCI-H520, A-427, Calu-3, SK-LU-1. Повышенная экспрессия перлекана в клеточных линиях рака легкого одного из самых агрессивных онкологических заболеваний подтверждает, что данный белок индуцирует опухолевый рост и прогрессию, в частности процессы метастазирования [31].

В целом в научной литературе имеются несколько работ по изучению паттернов экспрессии ПГ в различных линиях опухолевых клеток *in vitro* и опухолей *in vivo* — в клетках рака яичника человека *in vitro* показана экспрессия синдеканов-1, -2, -4, глипиканов-1, -3, -5 и CD44 [32]; в опухолевых клетках *in vitro* и опухолях прямой кишки человека *in vivo* экспрессируются синдекан-1, глипикан-1, перлекан, декорин, бигликан, версикан, агрекан, серглицин, NG2, бревикан, люмикан и CD44 [27]; в опухолях плоскоклеточного рака гортани — агрекан, версикан, декорин и бигликан [30]; в образцах нейроэндокринных опухолей человека — глипиканы-1, -5 и синдекан-2 [29]; в злокачественной мезотелиоме — синдеканы-1, -2, -4, бигликан и версикан [29]. Однако все эти исследования проводили с использованием различных методов и для разного набора ПГ, в силу чего сопоставление данных в плане определения тканеспецифичности паттерна экспрессии ПГ является затруднительным. В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ состава и уровня экспрессии ПГ в различных линиях опухолевых клеток и показано, что наряду с тканеспецифичными особенностями паттерна экспрессии ПГ существуют особенности, присущие морфологически различным видам опухолевых клеток в пределах одной ткани. Выявление ПГ, ассоциированных с наиболее агрессивными подтипами опухолевых клеток, позволяет предложить их в качестве новых прогностических маркеров тяжести течения заболевания.

Важным аспектом анализа полученных данных является их сопоставление с результатами аналогичных экспериментов, проведенных нами ранее для различных типов опухолей человека *in vivo*. Показано, что рак молочной железы [25], предстательной железы [26] и прямой кишки [27] характеризуются специфическими паттернами экспрессии ПГ, что указывает на тканеспецифичность экспрессии и паттерна ПГ в различных опухолях *in vivo*. Вместе с тем в опухолях предстательной железы *in vivo* наблюдается определенная вариабельность паттернов экспрессии ПГ [26], связанная, по-видимому, с различными морфологическими характеристиками индивидуальных опухолей. Представленные в настоящей работе результаты хорошо согласуются с этими данными и впервые идентифицируют ПГ как потенциальные биомаркеры для индивидуализированной диагностики наиболее агрессивных подтипов опухолевых клеток.

Заключение

Таким образом, в данной работе впервые охарактеризованы паттерны экспрессии ПГ в опухолевых клеточных линиях различного морфологического происхождения и показаны тканеспецифичные особенности экспрессии ПГ. С учетом вариабельности экспрессии определенных ПГ в опухолевых клетках различной степени агрессивности можно говорить о важном вкладе ПГ в явление гетерогенности опухолевых клеток и предложить новые молекулярные маркеры для персонализированной диагностики опухолей и выработки оптимальной стратегии их лечения.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(гранты 12-04-01657, 24-04-01283).*

*Авторы выражают благодарность
д.б.н. В.И. Кашубе за помощь и поддержку при выполнении работы, к.б.н. Л.А. Мостович за техническую
помощь при проведении иммуноокрашивания.*

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

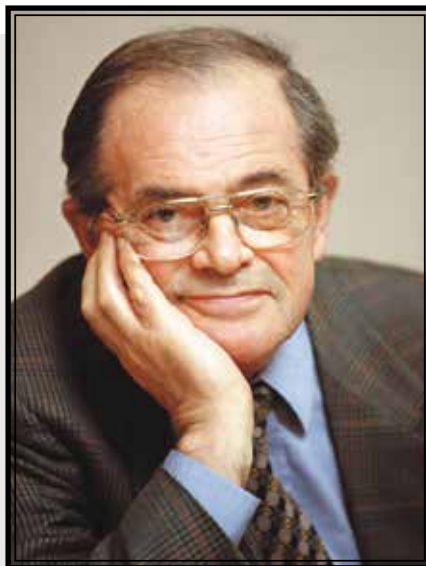
1. Sarrazin S., Lamanna W.C., Esko J.D. Heparan sulfate proteoglycans. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3(7):pii:a004952.
2. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Tzanakakis G.N., Karamanos N.K. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. FEBS J 2010;277:3904–23.
3. Dietrich C.P., Nader H.B., Straus A.H. Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. Biochem Biophys Res Commun 1983;111(3):865–71.
4. Gharbaran R. Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 2015;94(1):1–17.
5. Liu W., Litwack E.D., Stanley M.J. et al. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Syndecans and glypican have distinct functions. J Biol Chem 1998;273:22825–32.
6. Beauvais D.M., Burbach B.J., Rapraeger A.C. The syndecan-1 ectodomain regulates alpha-vbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. J Cell Biol 2004;167:171–81.
7. Shi X., Liang W., Yang W., et al. Decorin is responsible for progression of non-small-cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis. Tumour Biol 2015;36(5):3345–54.
8. Iozzo R.V., Sanderson R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. J Cell Mol Med 2011;15(5):1013–31.
9. Gotte M., Kersting C., Ruggiero M. et al. Predictive value of syndecan-1 expression for

- the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Anticancer Res* 2006;26:621–7.
10. Juuti A., Nordling S., Lundin J. et al. Syndecan-1 expression – a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncology* 2005;68(2–3):97–106.
 11. Wiksten J.P., Lundin J., Nordling S. et al. Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2001;95:1–6.
 12. Hasengaowa, Kodama J., Kusumoto T. et al. Prognostic significance of syndecan-1 expression in human endometrial cancer. *Ann Oncol* 2005;16(7):1109–15.
 13. Kusumoto T., Kodama J., Seki N. et al. Clinical significance of syndecan-1 and versican expression in human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep* 2010;23:917–25.
 14. Ibrahim S.A., Hassan H., Vilardo L. et al. Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling. *PloS One* 2013;8(12):e85737.
 15. Kim S.Y., Choi E.J., Yun J.A. et al. Syndecan-1 Expression Is Associated with Tumor Size and EGFR Expression in Colorectal Carcinoma: a Clinicopathological Study of 230 Cases. *Int J Med Sci* 2015;12(2):92–9.
 16. Shimada K., Anai S., Fujii T. et al. Syndecan-1 (CD138) contributes to prostate cancer progression by stabilizing tumour-initiating cells. *J Pathol* 2013;231(4):495–504.
 17. Zellweger T., Ninck C., Mirlacher M. et al. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate* 2003;55(1):20–9.
 18. Xu Y., Yuan J., Zhang Z. et al. Syndecan-1 expression in human glioma is correlated with advanced tumor progression and poor prognosis. *Mol Biol Rep* 2012;39(9):8979–85.
 19. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Tzanakakis G., Karamanos N.K. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2010;277(19):3904–23.
 20. Iozzo R.V., Moscatello D.K., McQuillan D.J., Eichstetter I. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1999;274(8):4489–92.
 21. Merline R., Moreth K., Beckmann J. et al. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and Cancer through PD CD4 and microRNA-21. *Sci Signal* 2011;4(199):ra75.
 22. Albig A.R., Roy T., Becenti D.J., Schiemann W.P. Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression induced by growth on matrigel matrices: identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis. *Angiogenesis* 2007;10(3):197–216.
 23. Matsuda Y., Yamamoto T., Kudo M. et al. Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2008;33:1177–85.
 24. Ishiwata T., Cho K., Kawahara K. et al. Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Onc Rep* 2007;18(3):537–43.
 25. Eshchenko T.Y., Rykova V.I., Chernakov A.E. et al. Expression of different proteoglycans in human breast tumors. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72(9):1016–20.
 26. Suhovskih A.V., Mostovich L.A., Kunin I.S. et al. Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer. *ISRN Oncol* 2013;2013:680136.
 27. Suhovskih A.V., Aidagulova S.V., Kashuba V.I., Grigorieva E.V. Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer. *Cell Tissue Res* 2015;361(3):833–44.
 28. Skandalis S.S., Theocharis A.D., Theocharis D.A. et al. Matrix proteoglycans are markedly affected in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689(2):152–61.
 29. Gulyás M., Hjerpe A. Proteoglycans and WT1 as markers for distinguishing adenocarcinoma, epithelioid mesothelioma, and benign mesothelium. *J Pathol* 2003;199(4):479–87.
 30. García-Suárez O., García B., Fernández-Vega I. et al. Neuroendocrine tumors show altered expression of chondroitin sulfate, glypican 1, glypican 5, and syndecan 2 depending on their differentiation grade. *Front Oncol* 2014;4:15.
 31. Nackaerts K., Verbeken E., Deneffe G. et al. Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells. *Int J Cancer* 1997;74(3):335–45.
 32. Kokenyesi R. Ovarian carcinoma cells synthesize both chondroitin sulfate and heparan sulfate cell surface proteoglycans that mediate cell adhesion to interstitial matrix. *J Cell Biochem* 2001;83(2):259–70.

Памяти Фёдора Львовича Киселёва (28.12.1940–04.02.2016)

После окончания биолого-химического факультета Московского педагогического государственного института в 1963 г. Фёдор Львович Киселёв проходил обучение в аспирантуре Научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, где в 1966 г. защитил кандидатскую диссертацию. С 1966 по 1975 г. работал в должности младшего научного сотрудника, затем старшего научного сотрудника того же института. В эти годы Фёдор Львович активно начал заниматься изучением молекулярно-биологических свойств онкорнавирусов и в феврале 1975 г. защитил докторскую диссертацию. С августа 1975 г. Ф.Л. Киселёв — сотрудник Онкологического научного центра АМН СССР, в котором в 1978 г. возглавил лабораторию молекулярной биологии вирусов, позднее — отдел трансформирующих генов опухолей НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Ф.Л. Киселёву принадлежат первые работы в области молекулярной онковирусологии. Большую известность получили его работы по исследованию вирусных онкогенов и опухолеродных вирусов человека и животных, в частности вирусов папиллом человека, опубликованные в ведущих международных журналах. Фёдор Львович одним из первых инициировал изучение структуры и функции онкогенов в опухолях, трансформирующих генов опухолей человека



4 февраля 2016 г. после тяжелой продолжительной болезни на 76-м году жизни скончался Фёдор Львович Киселёв, выдающийся вирусолог, ученый с мировым именем, долгое время руководивший отделом трансформирующих генов опухолей Научно-исследовательского института канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, профессор, член-корреспондент РАН.

в целях выявления молекулярных опухолевых маркеров, генетической нестабильности и клональности опухолей. Он уделял большое внимание изучению эпигенетических механизмов регуляции и по праву считается одним из основоположников молекулярной онкологии в нашей стране.

Ф.Л. Киселёв является соавтором нескольких монографий и более 300 научных работ, которые получили международное признание. Он был хорошо известен за рубежом, неоднократно получал международные гранты и работал с ведущими онковирусологами мира.

Выдающиеся научно-организационные способности Фёдора Львовича Киселёва, умение заинтересовать коллектив идеями и подходами позволили ему активно развивать новые направления и привлекать молодых исследователей. Он создал собственную научную школу, под его руководством защищено более 30 кандидатских и докторских диссертаций, многие молодые ученые нашей страны и из-за рубежа стремились попасть в его лабораторию на стажировку. Сегодня ученики Фёдора Львовича работают в ведущих научных институтах разных стран.

Все, кто его знал, признают, что Фёдор Львович был очень энергичным, инициативным человеком, отличался принципиальностью и высокой требовательностью. Работать с ним было интересно.

Мы все потеряли коллегу, не только выдающегося ученого, но и товарища, всегда готового прийти на помощь. Светлая память о Фёдоре Львовиче Киселёве навсегда останется в наших сердцах.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

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

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) на адрес: **adv.mol.onc@rnc.ru**.

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

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

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

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

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

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

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

4. Иллюстративный материал:

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

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

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

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

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

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

5. Единицы измерений даются в СИ.

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

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

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

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

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

- При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи; название журнала, год, том, номер выпуска, страницы.

- При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания.

- При ссылке на **авторефераты диссертаций** указывают также полное название работы, вид диссертации (докторская или кандидатская), год и место издания.

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

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

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

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Статьи, подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренные сроки.

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

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

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

