

Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике

И.Б. Зборовская

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина»,
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;
ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина», Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Борисовна Зборовская zborovskaya@mail.ru

В основе онкологических заболеваний и их прогрессии лежит каскадный процесс накопления генетических повреждений, затрагивающих не менее 20 генов, и поэтому важность молекулярно-генетических исследований для клинической онкологии не вызывает сомнений. Современные методы молекулярной биологии, позволяющие детерминировать структурные и функциональные изменения генов и их продуктов, которые могут служить специфическими маркерами опухолевого роста, открывают принципиально новые возможности в клинической онкологии. В обзоре рассматриваются пути совершенствования критериев для формирования диагностических тестов, оценки молекулярных факторов течения болезни и эффективности проводимых лечебных мероприятий. Для определения спектра маркеров особое внимание должно быть направлено на исследование путей передачи сигналов ключевых генов опухолевого роста и их ближайших партнеров. Одним из важных аспектов является корректное формирование групп пациентов и коллекций образцов. Подчеркивается необходимость объединения в рамках единых программ традиционных способов диагностики и лечения с современными методами молекулярно-генетического тестирования и биоинформатики.

Ключевые слова: онкомаркеры, сигнальные пути, герминальные мутации, аллельный полиморфизм, микроРНК, метилирование ДНК, полиаденилирование, сплайсинг, транскриптом, стволовые клетки опухоли

Modern strategies for study of tumor's markers in clinical practice

I. B. Zborovskaya

Scientific Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia,
115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24;
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24

Importance of molecular genetics-based essays in clinical oncology is now unquestionable due to the fact that all oncological diseases and their progression are based on cascading accumulation of genetic aberrations involving more than 20 different genes. Essentially new capacities of clinical oncology are uncovered with the help of modern molecular biology methods that allow to determine structural and functional changes of genes and their products. This review examines approaches to improve criteria for creating diagnostic essays, evaluation of treatment efficiency and molecular factors of clinical course. In order to determine relevant markers, special consideration should be given to the research of signal transduction pathways involving key genes responsible for tumor growth and their partners. The correct formation of patient's groups and selection of samples is very important. It is emphasized that integrated clinical programs should combine traditional methods of diagnostics and treatment with modern molecular testing and bioinformatics methods.

Key words: oncomarkers, signaling pathways, germline mutations, allelic polymorphism, microRNA, DNA methylation, polyadenylation, splicing, transcriptome, tumor stem cells

Введение

Молекулярная биология находится сейчас на такой стадии развития, когда уже накоплен достаточный объем знаний о молекулярных изменениях, свойственных развитию и течению той или иной патологии. Сочетание исследований в области молекулярной онкобиологии с данными клинических реестров является необыкновенно продуктивным как в определении фундаментальных основ опухолевого роста, так и в плане диагностики и лечения опухолевых заболеваний. Молекулярная онкобиология активно интегрирует в практическую медицину. К 2014 г. только в PubMed зафиксировано более 40 тыс. публикаций, посвященных исследованию молекулярных онкомаркеров в клини-

ке, не считая огромного количества работ, проводимых на клеточных линиях и экспериментальных животных.

Еще несколько лет назад острой проблемой молекулярной онкологии являлась идентификация отдельных генетических факторов, ассоциированных с канцерогенезом. Современная наука требует исключительно комплексного подхода и анализа не только значения отдельных молекулярно-генетических нарушений, но, в первую очередь, механизмов изменений функционирования внутриклеточных сигнальных путей, вызванных тем или иным генетическим событием, а также анализа условий развития опухолевого очага на уровне целого организма. Кроме того, за по-

следние годы существенно возрос технологический уровень исследований, изменились методические подходы, что способствовало глобальному увеличению объема знаний о путях системной регуляции метаболических процессов как на клеточном уровне, так и в организме в целом. Современные геномные и протеомные технологии, применяемые или разрабатываемые, предоставляют возможность составления в самом ближайшем будущем так называемой индивидуальной «биопробисы» состояния здоровья и возможных заболеваний человека, в том числе и онкологических. Начинается век молекулярной медицины, и сейчас на повестку дня остро поставлен вопрос обобщения уже полученной информации. Поэтому назрела необходимость по-новому взглянуть на перспективы и тактику применения молекулярных маркеров в онкологической практике с учетом современных достижений молекулярной биологии.

Общие положения

Риск возникновения, гистогенез, темпы роста опухоли и прогрессия заболевания в немалой степени определяются структурными особенностями и/или абберациями клеточного генома. С возникновением и прогрессией опухоли могут быть связаны как детерминированные в геноме параметры (например, нормальный аллельный полиморфизм генов или герминальные мутации), так и изменения, появляющиеся *de novo* при злокачественной трансформации и развитии опухолевого процесса. К молекулярно-генетическим маркерам опухолевого роста и прогрессии следует отнести точечные мутации в кодирующих и регуляторных областях генов, амплификацию или утрату отдельных аллелей и генных локусов вследствие делеций и хромосомных перестроек, модуляцию экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции, изменение внутриклеточной локализации и модификации белковых молекул.

Малигнизация нормальных клеток является следствием каскадного накопления различных нарушений. Предполагается, что для развития рака у человека необходимы изменения не менее 6–10 генетических факторов [1, 2].

Вследствие генетической нестабильности любая группа трансформированных клеток представляет собой гетерогенную популяцию. Это дает возможность неконтролируемого отбора признаков, необходимых для формирования и закрепления опухоли в организме. Принято считать, что такими признаками являются приобретение способности к бесконечному делению, самодостаточность в ростовых факторах, нечувствительность к ингибиторам роста, уклонение от клеточной гибели, стимуляция ангиогенеза и метастазирование [2–5].

Генетическая нестабильность, являющаяся неотъемлемой чертой опухолевой прогрессии, обусловлена, в первую очередь, нарушениями в системе генов, кон-

тролирующих целостность генома, что резко увеличивает вероятность появления и накопления мутаций [6–9]. Большое значение придается исследованиям факторов эпигенетической регуляции (например, метилирование CpG-островков ДНК, модификация гистоновых комплексов, альтернативное полиадактирование и альтернативный сплайсинг), определяющих состав транскриптома [6, 9–14]. Значительный вклад в малигнизацию клетки вносят повреждения генов, участвующих в процессах регуляции клеточного роста и дифференцировки, которые часто являются онкогенами и генами-супрессорами опухолевого роста (антионкогенами), в частности факторов роста, их рецепторов, гуанозинтрифосфатаз и т. д. [15]. Совместное функционирование генов, кодирующих нормальные регуляторы клеточного цикла и определяющих скорость клеточного деления, а также про- и анти-апоптотические факторы, оказывает значительное влияние на баланс процессов пролиферации и гибели опухолевых клеток, а следовательно, рост опухолевых клонов. Кроме того, существует большая группа генов-модуляторов, напрямую не отвечающих за злокачественную трансформацию клеток, но способствующих распространению опухоли в организме [3, 16]. К ним относятся гены иммунного ответа, цитокины, гены, контролирующие функционирование протеолитических ферментов, везикулярный транспорт, неоангиогенез и т. п. Очень важно учитывать участие транскрипционных факторов в определении злокачественного потенциала клеток [2, 4, 13, 17]. Роль их на различных стадиях опухолевой прогрессии до сих пор остается несколько в тени.

Все генетические, эпигенетические и регуляторные нарушения трансформирующих генов реализуются на уровне изменения их экспрессии, т. е. уровня белковой продукции. Структурные модификации белков (фосфорилирование, пальмитилирование, миристилирование, сумоилирование, убиквитинирование и т. п.) и изменение их внутриклеточной локализации также изменяют их экспрессию и сигналинг, что имеет различные аспекты влияния на клеточный метаболизм [18–20]. Важное значение имеют и модуляции состава и структуры клеточных мембран, влияющие на функционирование многих процессов, в том числе и на сигнальную трансдукцию [21–23].

С открытием новых методик исследования генов, белков и тканей, полной расшифровкой генетического кода человека и интенсивным изучением сигнальных путей достигнут большой прогресс в определении особенностей функционирования генов и их продуктов в различных типах опухолей. Одним из многообещающих подходов являются исследования нового класса регуляторных молекул генной транскрипции — микроРНК [5, 24–27], а также изучение так называемых стволовых клеток опухолей (СКО) [27–30]. В настоящее время эти достижения являются в основном прерогативой экспериментальных лабораторий, и пу-

ти их внедрения в клиническую практику находятся в стадии разработок [31–34]. Внимание же практической молекулярной онкологии пока сосредоточено на тех известных изменениях, детекция которых в качестве молекулярных онкомаркеров уже сейчас может служить характеристикой тех или иных клинических параметров в группах онкологических больных или у отдельных индивидуумов.

Практические аспекты исследования онкомаркеров в клинической практике

В исследованиях маркеров опухолевого роста существует два основных аспекта: фундаментальный и клинический.

Фундаментальный аспект. Определение молекулярных маркеров в биопсийных образцах, клеточных линиях и ксенографтах опухолей человека в первую очередь дает не только представление о функционировании метаболических систем конкретной опухоли и биологических особенностях определенного гистологического типа новообразования, но и общие знания о природе опухолевого роста. Кроме того, экспериментальные разработки служат платформой для создания новых и эффективных таргетных препаратов.

В данном обзоре мы более подробно остановимся на **клинических аспектах**.

Диагностический аспект. Хотя спектр как наследуемых, так и соматических изменений генов в случае каждой конкретной опухоли носит индивидуальный характер, тем не менее наблюдаются определенные закономерности генных модификаций, которые дают основания связать их с развитием или характером прогрессии той или иной патологии и выделить соответствующую группу диагностических онкомаркеров. Такие маркеры используются:

1) для формирования групп риска развития тех или иных опухолевых заболеваний как в семьях с отягощенной онкологической наследственностью, так и при спорадических формах;

2) в качестве тестов для досимптоматической диагностики;

3) при дифференциальной диагностике тех или иных гистологических форм.

К сожалению, очень небольшой список одиночных онкомаркеров может служить целям как первичной, так и дифференциальной диагностики. Очевидно, что молекулярная онкодиагностика требует комплексного подхода и выявления не единичных генетических и/или метаболических молекулярных нарушений, а использования панелей тестов как для определенной совокупности опухолей, объединенных по этиологическим или гистологическим критериям, так и для каждого типа неоплазии. Следует отметить, что многие маркеры предрасположенности к возникновению спорадических солидных опухолей, хотя и являются потенциально полезными инструментами скрининга, пока не получили широкого распространения. Исклю-

чение составляют полиморфизмы и герминальные мутации, исследования которых интенсивно развиваются и имеют широкий выход в практику (медико-генетическое консультирование в отдельных популяциях, семьях с отягощенной наследственностью и группах людей, подвергнутых действию канцерогенных факторов) [35–37].

Прогностический аспект. Определение маркеров опухолевой прогрессии проводится:

1) с целью выявления метастазов и рецидивов первичного очага;

2) для прогнозирования течения опухолевого процесса (скорости прогрессирования заболевания и уровня выживаемости больных);

3) при мониторинге возможности и сроков появления очагов вторичного роста.

Вероятно, что способность метастазировать может быть приобретена отдельными клонами опухолевых клеток уже на ранних стадиях канцерогенеза, в то время как активная реализация этой способности осуществляется в ходе опухолевой прогрессии [3, 5, 38–40]. При проведении сравнительного анализа мутационного статуса и/или генной экспрессии с целью выявления маркеров, ассоциированных с метастазированием, необходимо учитывать как морфологическую, так и генетическую гетерогенность не только популяции опухолевых клеток, но и микроокружения опухоли, стволовых клеток, а также системную реакцию организма (изменение гормонального статуса, иммунологические маркеры и т.д.) [3–5, 16, 28, 40–42].

Существуют предпосылки использования данной группы онкомаркеров и для корректного стадирования онкозаболевания.

Предсказательный (предиктивный) аспект. В англоязычной литературе при обозначении онкомаркера, предсказывающего ответ на проводимую химиотерапию, широко используется устоявшийся термин *predictive marker*. Такие маркеры применяются:

1) при определении эффективности и коррекции проводимых лечебных мероприятий, в частности воздействия химиотерапевтических агентов и таргетных препаратов;

2) для изучения механизма действия отдельных химиопрепаратов и их комбинаций;

3) в разработке новых подходов к лечению онкологических больных методами гено- и сигналотерапии.

Исследования данного класса маркеров — наиболее интенсивно развивающееся направление. При составлении прогноза для назначения противоопухолевого лечения строго необходимо формирование кластерных диагностикумов, как при определенном типе онкозаболевания, так и при применении конкретного противоопухолевого препарата. Кроме того, наряду с прогностическими и диагностическими, данные маркеры являются инструментом для индивидуализации лечения. Применение химиотерапевтиче-

ских препаратов, как классических, так и таргетных, способно кардинально изменять спектр, экспрессию, внутриклеточную локализацию, активность и, следовательно, функционирование целого ряда белков и ассоциированных с ними сигнальных путей. Таким образом, с помощью определения индивидуального спектра предиктивных маркеров для каждого больного становится возможен мониторинг эффективности проводимой терапии.

Более детально использование прогностических и предиктивных панелей будет рассмотрено в соответствующих главах данного обзора. Следует отметить, что их спектры часто пересекаются, т. е. многие прогностические маркеры могут служить и предиктивными.

Тактика молекулярного тестирования

Используемые биопсийные материалы и требования к составлению выборки пациентов и коллекций образцов.

Как для выявления значения того или иного молекулярного нарушения или изменений функционирования группы генов и их продуктов на различных этапах канцерогенеза, так и при оценке влияния наличия молекулярных маркеров на отдаленные показатели результатов хирургического лечения (общую или безрецидивную выживаемость) крайне важно корректно формировать группы больных, обязательно учитывая следующее:

- 1) морфологические параметры исследуемой опухоли, в первую очередь гистологический тип новообразования, а также уровень дифференцировки и анаплазии клеток, тонкую структуру опухолевого образца (наличие стромальных элементов, участков другой гистологической структуры, степень васкуляризации, некротические изменения и т. д.);
- 2) клинически равную стадию развития процесса (глубину местной инвазии, наличие метастазов);
- 3) равнозначные параметры радикальности оперативного вмешательства;
- 4) проведенное до- и послеоперационное специальное противоопухолевое лечение.

Следует принимать во внимание также семейный онкологический анамнез, влияние внешних канцерогенных факторов (например, экспозиция родона, асбеста, курение, повышенная инсоляция и т. п.), хронические и сопутствующие заболевания другого профиля и применяемую при них терапию (в частности, иммуностимуляторы, антиоксиданты, витамины, препараты, содержащие никотин, и т. д.) [43]. Такие параметры, как пол, возраст и этническая принадлежность, также существенны, однако имеют большее значение для онкопатологий, связанных с наличием полиморфизмов, при определении риска в онкопораженных семьях и при гормонально-зависимых типах новообразований (рак молочной железы, яичников, щитовидной железы, простаты и т. п.) [36, 37, 44]. Возраст пациентов нужно учитывать и при формировании па-

нелей прогностических маркеров. В последние годы все большее внимание уделяется и особенностям питания. **Чем более однородными будут группы пациентов, тем выше шансы повысить специфичность тестирования.**

В зависимости от целей исследования молекулярно-генетическое тестирование может проводиться в тканевых и биопсийных образцах опухолевых и предопухолевых очагов, цельных биологических жидкостях и их фракциях (цельная кровь, лимфоциты, плазма, сыворотка, слюна, моча, панкреатический и желудочный сок), мокроте, пробах каловых масс.

Анализ молекулярного профиля нескольких тканевых и жидкостных образцов, полученных одновременно или последовательно от одного больного, расширяет возможности адекватной оценки клинических показателей.

Возможность параллельного взятия нескольких биопсий из одного патологического очага позволяет провести сравнительный анализ нарушений структуры и/или функционирования генома в различных участках малигнизированной ткани, как микроскопически однородных, так и морфологически различающихся. Кроме того, этот подход дает вероятность обнаружить такие нарушения только в одном из фрагментов анализируемой опухоли, что может оказать влияние при прогнозировании течения заболевания и результатов лечения [15, 45, 46].

В образцах, предназначенных для получения ДНК, РНК и белковых лизатов, должно содержаться не менее 60 % опухолевых клеток. Возвращаясь к морфологической структуре, необходимо еще раз подчеркнуть, что и опухолевые клетки, полученные от пациента, представляют собой, вследствие генетической нестабильности, гетерогенную популяцию. Все чаще анализ нарушений в биопсийном или операционном материале проводится с применением микродиссекции, обеспечивающей получение образца опухолевых клеток, свободных от элементов стромы, лимфоцитов или прилегающего нормального эпителия. Микродиссекцию возможно проводить в цитологических мазках и клетках, получаемых из кровяного русла [15, 47, 48].

Вопрос выбора нормальных аналогов (контролей) для исследования некоторых типов опухолей (например, рак яичников, саркомы) иногда затруднен. При взятии образца в качестве нормы необходимо строго следовать данным о гистогенезе первичного очага. Решение вопроса нормальных аналогов для исследования некоторых типов опухолей (например, саркомы, меланомы) должно учитывать также их локализацию. Очевидно, что при анализе опухолей, имеющих одну локализацию, но разную гистологическую форму, наборы диагностических и/или прогностических молекулярных маркеров отличаются, а химио- и генотерапия может иметь различные мишени для воздействия. Следует избегать использования в качестве нормальных контролей аутопсийных образцов.

Соблюдение временных рамок является очень важным условием при исследовании молекулярных маркеров в клинике. Можно выделить несколько аспектов этой проблемы.

Во-первых, образцы операционных материалов должны быть использованы или помещены в условия глубокой заморозки не позднее полутора-двух часов после изъятия. Для образцов крови при планировании получения только ДНК или микроРНК, вследствие их большей устойчивости к деградации, сроки могут быть несколько увеличены, но не более чем на час-полтора. Биопсийные пробы при эндоскопических исследованиях, вследствие их малых объемов, следует использовать для получения нуклеиновых кислот и белковых лизатов незамедлительно.

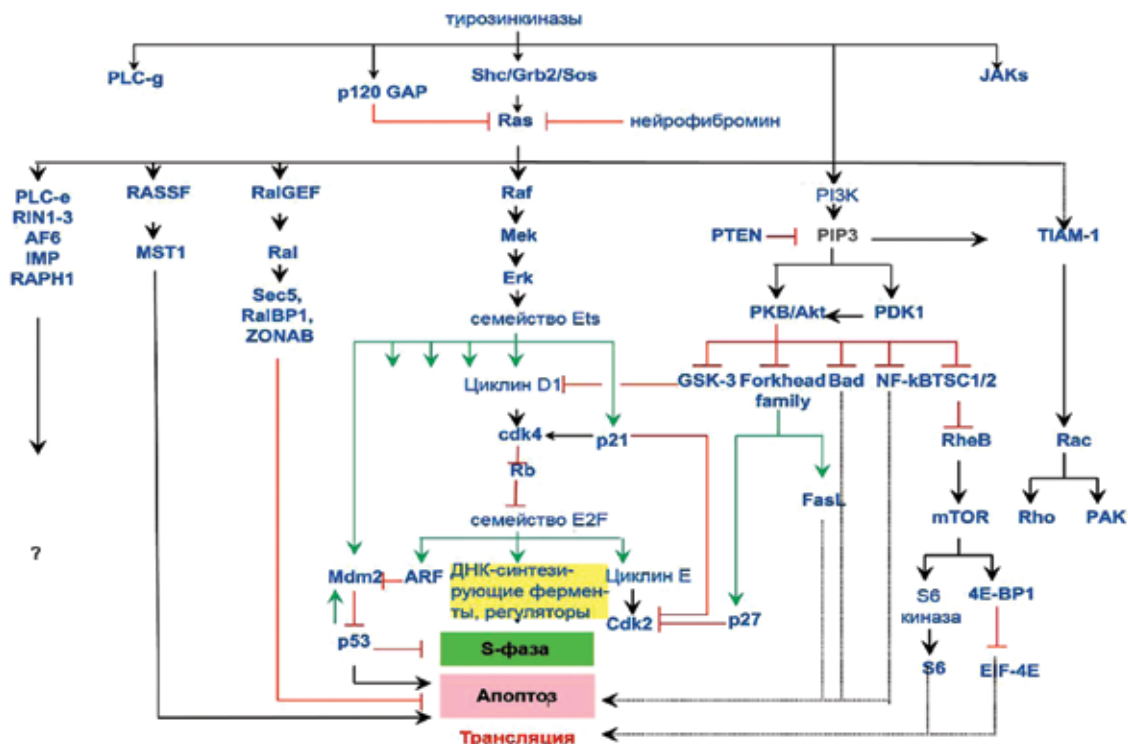
Во-вторых, взятие биологических жидкостей необходимо согласовать с сотрудниками клинических подразделений. Так, например, нельзя брать образцы крови для молекулярно-биологического исследования при гемотрансфузии и у прооперированных больных ранее 5 дней после вмешательства, так как в условиях возможности стресса и развития осложнений, а также применения послеоперационной лекарственной терапии (антибиотиков и т. п.) спектр маркеров может изменяться. При мониторинге эффективности лечения забор крови и биопсийного материала следует строго конкретизировать по срокам.

В-третьих, некоторые маркеры имеют значение при анализе образцов опухоли, находящейся на определенной стадии развития. Например, суперэкспрессия HRAS наблюдается, как правило, только на ранних

этапах малигнизации, и тестирование ее в образцах опухолей при запущенных стадиях не будет иметь crucialного значения [47].

Кроме того, должны развиваться стратегии ускорения тестирования биомолекулярных маркеров. Это касается всех этапов наблюдения — от постановки первичного диагноза до использования молекулярного мониторинга при химиотерапевтическом лечении запущенных стадий. Автоматизация и минимизация молекулярно-биологических процедур, техническое упрощение методик сильно продвинуло раннюю детекцию и будут способствовать более широкому их внедрению в клиническую практику.

Определение необходимого комплекса молекулярных нарушений. Существует множество различных маркеров, определяющих малигнизацию и опухолевую прогрессию, но клиническое значение каждого отдельного теста, как правило, невелико [35]. Однако целый ряд участников ключевых сигнальных путей (p53, EGFR, RAS-семейство, c-MYC, mTOR, AKT, Wnt, β -катенин, Notch и др.) демонстрируют достоверную значимость генетических и функциональных нарушений (мутации/делеции, гиперметилирование или изменение экспрессии) при прогрессии самых различных онкозаболеваний. Этот факт связан с тем, что эти гены являются ключевыми регуляторами внутриклеточных сигнальных путей [2]. В качестве примера хочется привести далеко не полную схему активируемых сигнальных путей и их регуляции для онкогенов семейства RAS (рисунок), демонстрирующую влияние единичных нарушений на функционирование всей сети. Реализация



Онкогены RAS: регуляция и активируемые сигнальные пути. Адаптировано из [49]

сигналов от mTOR или p53 представляется еще более сложной. Учитывая многообразие сигналов от ключевых белков, участвующих в канцерогенезе, и их влияние как на индукцию, так и на ингибирование процессов реализации трансформированного фенотипа, при применении их в качестве маркеров опухолевого роста обязательно следует принимать во внимание изменение экспрессии непосредственных и ближайших партнеров сигнальных путей таких генов [5, 20, 50, 51], а также возможности переключения на альтернативные пути реализации сигнала.

Одним из важнейших компонентов сигнальной трансдукции в любых клетках является плазматическая мембрана, состав и структура которой определяют очень многие опухоль-ассоциированные процессы. В частности, в специальных мембранных микродоменах — липидных рафтах, обогащенных холестерином, сфинголипидами и гликофинголипидами, а также различными белками, сосредоточены практически все рецепторы, в частности рецепторы факторов роста, интегринов и металлопротеаз, которые также являются опухолеспецифичными маркерами [21, 52]. Эти микродомены стабилизированы специальными микродомен-образующими белками и участвуют практически во всех аспектах жизнедеятельности клетки [53]. На сегодняшний день известно несколько семейств таких белков — кавеолы, SPFH-семейство, тетраспанины, галектины, многие из которых уже используются как маркеры прогрессии опухолевых заболеваний [23, 54–56]. Кроме того, репертуар микродомен-образующих белков в мембранах экзосом определяет специфичность попадания их содержимого, в первую очередь сигнальных белков и опухоль-ассоциированных микроРНК, в клетки тканей-мишеней, в том числе в районах формирования премегастатических «ниш» [34, 57, 58]. Объем данного обзора не позволяет рассмотреть роль экзосом и микроРНК в канцерогенезе, однако изменения их спектра в опухолях и циркулирующих жидкостях уже сейчас служат важными диагностическими и прогностическими показателями [31–34, 59, 60].

Известно, что именно особенности реализации сигналов ответственны за пролиферацию и дифференцировку клеток, а нарушения и, как следствие, аномальные переключения на этапах сигнальной трансдукции приводят к возникновению различных типов опухолей. Так, в прогрессии колоректальных раков мутации (в широком смысле) PIK3CA/PTEN/AKT ветви проведения сигнала от EGFR менее важны, чем изменения пути RAS/RAF/MAPK [51].

По мере открытия все новые и новые маркеры могут быть включены в диагностические и прогностические панели. Это принципиально новый инструмент, позволяющий врачу уточнить диагноз, сроки метастазирования и рецидивирования для каждого конкретного пациента. Этой цели и должны служить четко рассчитанные комплексы молекулярных нарушений,

сочетание которых достоверно определяет прогноз и предоставляет возможность индивидуально подобрать противоопухолевую терапию.

Следовало бы определить некие рамки для клиницистов, поставленных в трудную ситуацию, когда из множества статей, посвященных исследованию молекулярно-биологических маркеров, нужно вычленить тот спектр, который имеет действительное значение для диагностики, определения прогноза конкретной группы онкологических больных и тактики лечения и дальнейшего мониторинга каждого пациента. Так, например, при болезни Барретта и раке пищевода исследовано более 60 маркеров, но только несколько из них прошли III и IV стадии клинических испытаний, действительно представляющих интерес для онкологов-клиницистов [61], и ни один из этих маркеров, кроме широко известных, до сих пор не предложен для внедрения в повседневную клиническую практику.

Решением данной проблемы послужит идентификация достаточно информативного, но по возможности минимального спектра маркеров. В такие комплексы могут и должны входить тесты на различные типы изменений — от мутаций до белковых модификаций как непосредственно в опухолевой ткани, так и в организме носителя опухоли. Для стратификации пациентов на группы риска быстрого прогрессирования злокачественного процесса также необходимо использовать панели, причем, исходя из собственного многолетнего опыта, в эти панели должны входить от 5 до 15 маркеров, в зависимости от показателей их значимости. При определении сроков и уровня метастазирования у конкретного больного спектр маркеров может быть расширен или сужен исходя из первичного тестирования в панели маркеров риска быстрой прогрессии.

Очевидно, что в данном обзоре невозможно представить рекомендации по композиционному составу диагностикомов даже для одной из нозологических единиц, хотя такие работы в последнее время проводятся крайне интенсивно. В следующих двух главах приводятся примеры формирования достаточно ограниченных по составу, но специфичных и достоверно повторяющихся наборов маркеров.

Примеры использования онкомаркеров в прогнозировании течения злокачественного процесса и определении тактики противоопухолевой терапии

Одним из самых прогностически неблагоприятных онкозаболеваний является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), но использование только клинических и морфологических критериев не позволяет прогнозировать его течение после радикального хирургического лечения с достаточной точностью. Сегодня уже практически сформировано несколько вариантов панелей биомаркеров, на основании которых возможно в той или иной степени предсказать исход болезни [1, 62, 63].

В сентябре 2014 г. опубликовано масштабное исследование сотрудников NCI/NIH, определивших риск быстрого прогрессирования у 1069 радикально прооперированных больных аденокарциномой легкого I стадии в 12 когортах, представляющих различные этнические популяции. Отбор проводился на основании изменений экспрессии 4 генов — *BRCA1*, *HIF1A*, *DLC1* и *XPO1* — в опухолевых образцах. Для 10 из 12 когорт получены результаты, позволяющие стратифицировать группы высокого и низкого риска рецидивирования у пациентов с IA и IB стадиями заболевания. Данный пример демонстрирует, что высокодостоверный прогноз может быть определен при исследовании достаточно ограниченной, но тщательно подобранной панели маркеров [64].

В России также разработаны подходы к выработке алгоритма определения индивидуального прогноза больных НМРЛ после радикального лечения. Впервые проведено сравнение аденогенного и плоскоклеточного рака легкого по спектру 18 факторов, характеризующих клиническое течение онкологического процесса и биологические свойства опухолевого очага более чем у 200 больных. Впервые после комплексного исследования единого, строго стратифицированного по группам клинического материала был проведен многофакторный анализ для оценки весовой значимости каждого из изученных клинических, морфологических и молекулярно-биологических факторов в зависимости от распространенности опухолевого процесса. При регрессионно-факторном анализе в группах пациентов с различными клинико-морфологическими характеристиками, как то: гистологическая структура опухоли (плоскоклеточный рак и аденокарцинома легкого), наличие или отсутствие метастазов во внутригрудные лимфатические узлы (N0 и N+) выявлены значимые различия в молекулярно-биологических характеристиках опухолевого процесса. На основе полученных данных с высокой точностью можно разделить пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения заболевания и даже определить сроки безрецидивного периода для каждого, используя 5 маркеров различной природы (анеуплоидия опухоли, иммуногистохимическая экспрессия мутантного p53, BAX, BCL-2 и VEGF, делеции локуса 1p36.2). Полученные данные указывают на необходимость использования этих характеристик в комплексной оценке выживаемости больных НМРЛ после радикального хирургического лечения с учетом особенностей каждой группы и позволяют вплотную приблизиться к индивидуальному прогнозированию течения НМРЛ [65].

Тактика химиотерапевтического лечения может определяться разным спектром молекулярных маркеров и, как следствие, набором препаратов, учитывающих характер генетических повреждений и модифицирующих действие традиционных цитостатиков.

Пример правильного выбора комплекса маркеров для определения стратегии таргетной генотерапии ра-

ка легкого с использованием гефитиниба — ингибитора EGFR — продемонстрирован в совместном исследовании сотрудников Университета Онкологического центра и Центра изучения здоровья в Колорадо [66, 67]. Взаимодействующий с EGFR E-кадхерин, экспрессия которого во многом определяет прогноз при НМРЛ, ингибируется ZEB1 (zinc finger transcriptional repressor 1) при участии гистон-деацетилазы HDAC. После серии экспериментов по повышению чувствительности клеточных линий рака легкого к воздействию ингибиторов тирозинкиназ при добавлении ингибиторов HDAC (MS-275) авторы добились заметных успехов в преодолении резистентности к гефитинибу в группе больных НМРЛ при дополнительном лечении данных пациентов ингибиторами HDAC.

В практике передовых специализированных лечебных учреждений РФ для назначения адекватных противоопухолевых препаратов уже широко используется определение мутационных спектров ДНК опухолевых клеток и других маркеров. Лидерами подобных исследований являются сотрудники ФГБУ НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург) под руководством д.м.н., проф. Е.Н. Имянитова [35, 68–72] и ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» в содружестве с другими институтами и клиниками Москвы [65, 73–77]. В зарубежных клиниках онкологического профиля такие исследования стали повседневными и обязательными.

Сопряженные фундаментальные и клинические исследования онкомаркеров позволяют по-новому взглянуть на инновации в лечении онкологических больных.

В 2010 г. в самом авторитетном периодическом издании опубликован обзор, посвященный молекулярным механизмам действия препаратов ретиноевой кислоты и триоксида мышьяка (As_2O_3) при лечении больных острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ) [78]. Позитивное действие As_2O_3 на клеточную дифференцировку незрелых миелоцитов при лечении ОПЛ заключается в деградации аномального комплекса PML–RAR α , что опосредованно снижает репрессию транскрипции генов-мишеней. Предлагаемая авторами схема действия ретиноевой кислоты объясняет и отсутствие ответа на терапию ATRA при редкой форме транслокации, при которой образуется слитный протоонкоген PLZF–RAR α . Следует отметить, что антрациклины, используемые при лечении ОПЛ, также усиливают продукцию ROS. Авторы предполагают, что терапия, опосредованная применением препаратов, прицельно приводящих к деградации белков, является перспективным направлением в стратегии лечения многих типов злокачественных новообразований, вызываемых наличием патогенных слитных онкобелков или повышенной продукцией транскрипционных факторов.

Остается открытым очень важный вопрос о правомерности объяснений процессов клеточной дифференцировки результатами, полученными на клеточных линиях и ксенографтах опухолей человека у бестиму-

ных животных. Однако в данном случае выводы строго согласуются с клиническими наблюдениями и, безусловно, заслуживают самого пристального внимания гематологов. Высокая цена As_2O_3 , конечно же, может лимитировать применение данной схемы лечения, хотя данная проблема вполне разрешима.

Противоопухолевая терапия должна опираться не только на стохастическую, но, в первую очередь, на иерархическую модель строения опухоли, а именно учитывать состояние СКО. Первые сведения о существовании стволовых клеток в солидных опухолях появились в 2003 г., но уже к 2008 г. были открыты и протестированы рецепторы СКО: мембранный гликопротеин Pgp1 (CD44), мембранный гликопротеин проминин (CD133), альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1) и др. [28, 47, 79, 80]. Показано, что CD133+ клетки аденокарцином легкого устойчивы к действию цисплатина [81], а ALDH1+ клетки – к действию паклитаксела и таксола [82]. Повышенная экспрессия ALDH1 является предиктивным маркером хеморезистентности и в случае других онкозаболеваний, в частности при неoadьювантной терапии рака молочной железы [83].

В последнее время крайне интенсивно развивается использование малых интерферирующих РНК (siRNA) [84] и микроРНК в терапии различных патологий, что стало возможным благодаря уже доказанной диагностической и прогностической значимости ряда онко- или антионкомиров [26, 27, 32]. Примером микроРНК-терапии, достигшей стадии клинических испытаний, является препарат MRX34 (синтетический аналог miR-34 в липосомном векторе). Онкосупрессорное действие miR-34, ранее продемонстрированное на мышинной модели гепатоцеллюлярной карциномы, обусловлено тем, что мишенями для нее является целый ряд важных онкогенов, включая *MYC*, *MET*, *BCL2*, *CDK4* и др. [85]. В проводимом в настоящий момент исследовании I фазы (NCT01829971) участвуют пациенты с нерезектабельным первичным раком печени, а также другими опухолями с диагностированными печеночными метастазами.

Прочие микроРНК-агенты, в том числе и ингибиторы miR-21, экспрессия которой ассоциирована с высокой агрессивностью многих типов раков [86], пока находятся на стадии доклинических и первых фаз клинических исследований. Особого внимания заслуживают микроРНК, регулирующие функционирование СКО [27, 29, 34]. К настоящему времени в одобренную клиническую практику в России еще не введены препараты, основанные на микроРНК или взаимодействии с микроРНК, однако появления подобных средств можно ожидать в ближайшем будущем.

Методологические подходы в определении тех или иных генетических нарушений и их развитие

Высокотехнологичные методы кардинально меняют тактику не только фундаментальных, но и приклад-

ных молекулярных исследований. Однако в настоящее время в клинической практике применяются уже зарекомендовавшие себя методики: иммуногистохимия, иммуноцитохимия, диагностика методом полимеразной цепной реакции, проточная спектрофотометрия и т.д. Отдельные крупные клиники в России для определения мутационного статуса все шире используют секвенирование по Сэнгеру, биочипы и масс-спектроскопию [74, 75, 87].

Для демонстрации гиперэкспрессии или потери функции и молчания генов на уровне продукции белков в клинике используются различные методы, в первую очередь иммуногистохимия на биопсийных или цитологических препаратах и ELISA. Белковая экспрессия некоторых генов в тканях, определяемая с помощью масс-спектропии и вестерн-блоттинга, должна подтверждаться с применением иммуногистохимических процедур. Вестерн-блоттинг также необходим для анализа модифицированных форм белка. Альтернативой иммуногистохимии является использование молекулярных «маяков» – строго специфических последовательностей с флуоресцентными довесками, позволяющими детектировать клетки, содержащие мутантные или неэкспрессируемые в норме гены и белки, как в тканях, так и в биологических жидкостях (FISH-диагностика, иммуноферментный анализ и т.п.) [76, 88].

Инновационные методы молекулярно-биологических исследований и широкое внедрение биоинформатических программ определяют новые направления молекулярного скрининга и тактику лечения онкологических больных. В настоящее время на первый план в онкомолекулярной диагностике при определении химиотерапевтической лечебной тактики или прогнозировании течения опухолевого процесса выходят микрочипирование и методы секвенирования нового поколения (NGS) [33]. Однако даже в самых современных и перспективных методах, посвященных сравнительному анализу экспрессии генов, существует ряд несовершенств. Следует отметить, что, применяя в целях сравнения различных опухолей или групп пациентов микрочипы, нужно пользоваться каким-либо одним источником их получения. Ввиду разного качества предлагаемых чипов (на рынке в настоящее время – 5–6 крупных компаний) сравнение одних и тех же образцов, даже с применением сходных панелей ДНК и РНК, дает иногда разночтение. Следует отметить, что в рамках одного исследования предпочтительно пользоваться одним источником получения антител или проводить уточняющий сравнительный анализ результатов, полученных с применением антител к одному белку, предлагаемых разными производителями.

Современный уровень развития молекулярной онкологии свидетельствует о несомненной важности изучения наличия изоформ мРНК, образующихся в результате мутаций, аномального полиаденилирова-

ния или альтернативного сплайсинга, и здесь на авансцену выходят методы масштабного глубокого секвенирования экзонов и транскриптомов [89]. В отличие от экспрессионных микрочипов, РНК-секвенирование позволяет получить точную количественную информацию о представленности различных транскриптов в пробе. Эти методы необходимы также при определении спектра микроРНК. Однако для практического внедрения необходимо получить достоверную качественную информацию о клинической значимости каждого сплайс-варианта или микроРНК и их сочетаний в зависимости от цели применения возможного маркера. Сложное программное обеспечение и отсутствие повторяющихся результатов сегодня лимитируют практическое использование этих экспериментальных разработок.

Основным недостатком микроРНК как биомаркеров является высокая вариабельность уровня их экспрессии в зависимости от целого ряда факторов. Наборы микроРНК-кандидатов, составленные в результате независимых исследований, могут очень сильно различаться между собой, что требует дополнительной валидации с расширением выборки, строгой нормализацией и статистической обработкой. К преимуществам микроРНК в качестве биомаркеров можно отнести универсальность детекции, высокую чувствительность и относительную стабильность при хранении. Отдельные микроРНК и их сочетания уже сейчас предлагаются в качестве диагностических маркеров и факторов прогноза.

Одним из серьезных вопросов в исследованиях прогностических маркеров является также **грамотный выбор объектов сравнения**. Наиболее существенная проблема – подбор клеток, близких по происхождению, но различных по метастатической активности. Зачастую поиск генов, вовлеченных в проявление метастатического потенциала, проводится путем сравнения клеток, полученных из первичных и вторичных опухолей одного и того же пациента. Альтернативой образцов из вторичных опухолей могут служить высокометастатические варианты клеточных линий, полученные селекцией *in vivo* у иммунодефицитных животных. Кроме того, вероятно, что способность метастазировать может быть приобретена отдельными клонами опухолевых клеток уже на ранних стадиях канцерогенеза, в то время как активная реализация этой способности осуществляется в ходе опухолевой прогрессии. Таким образом, еще раз необходимо подчеркнуть, что при проведении сравнительного анализа генной экспрессии с целью выявления маркеров, ассоциированных с метастазированием, необходимо учитывать

как морфологическую, так и генетическую гетерогенность популяции опухолевых клеток [13, 40, 90].

Очень полезным инструментом в проверке и оценке результатов молекулярного тестирования служат многочисленные биоинформационные базы данных, с помощью которых можно более адекватно формировать и панели онкомаркеров. Например, в связи с возникшей потребностью организовывать и систематизировать информацию об открываемых микроРНК создана очень удобная специализированная база данных (miRBase). В настоящее время база поддерживается Манчестерским университетом и является основным централизованным хранилищем информации, куда в обязательном порядке заносятся все вновь открываемые микроРНК, данные об их геномной локализации, последовательности и экспрессии [91, 92]. Текущая версия базы (выпуск № 21 от июня 2014 г.) содержит сведения о 28 645 микроРНК, включая 2588 человеческих, и доступна на сайте <http://mirbase.org>. В будущем планируется создание компьютерной базы, содержащей сведения и о прогностических и предиктивных диагностикумах.

Заключение

В недалеком будущем широкое использование молекулярно-генетических тестов в клинической практике может расширить возможности диагностики онкопатологии, а также способствовать разработке более точных прогностических критериев, что позволяет надеяться на существенное улучшение результатов лечения этого грозного заболевания. Современные тенденции использования молекулярных маркеров в клинической практике заключаются в персонализации прогноза и индивидуальном подходе к лечению онкологических больных. Учитывая системный характер онкопатологий, на сегодняшний день очевидно, что при их исследовании наиболее целесообразен комплексный подход.

Помимо совершенствования непосредственно хирургических и терапевтических методов лечения онкологических заболеваний, формирование групп канцерогенного риска, разработка новых методов ранней диагностики, точное прогнозирование течения заболевания и индивидуализация противоопухолевой терапии могут значительно повысить эффективность медицинской помощи и снизить затраты на обследование и лечение онкологических больных. Таким образом, работы, направленные на изучение молекулярно-генетических нарушений, необходимы для разработки более специфичных молекулярных маркеров, а также более чувствительных методов их детекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sato M., Shames D.S., Gazdar A.F., Minna J.D. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2(4):327–43.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
3. Langley R.R., Fidler I.J. The seed and soil hypothesis revisited – the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* 2011;128(11):2527–35.
4. Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов. *Клиническая онкогематология* 2012;5(3):165–83. [Kopnin B.P. Modern conceptions of malignant growth mechanisms: similarities and differences of solid tumors and leukosis. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2012;5(3):165–83. (In Russ.)]
5. McAllister S.S., Weinberg R.A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol* 2014;16(8):717–27.
6. Verma M., Manne U. Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;60(1):9–18.
7. Thomas R.K., Baker A.C., Debiasi R.M. et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 2007;39(3):347–51.
8. Hesson L.B., Hitchins M.P., Ward R.L. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20(3):290–8.
9. Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res* 2012;318(4):299–310.
10. Suzuki H., Yamamoto E., Maruyama R. et al. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2014. pii: S0006-291X(14)01221–2. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.007.
11. Shames D.S., Minna J.D., Gazdar A.F. DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med* 2007;7(1):85–102.
12. Киселева Н.П., Киселев Ф.Л. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в вирус-ассоциированных опухолях человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):48–55. [Kiseleva N.P., Kiselev F.L. Epigenetic regulation of gene expression in virus-associated human tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):48–55. (In Russ.)].
13. Tam W., Weinberg R. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* 2013;19(11):1438–49.
14. Curinha A., Braz S.O., Pereira-Castro I. et al. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus* 2014;5(6). PMID: 25191751.
15. Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 5):843–6.
16. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012;21(3):309–22.
17. Недоспасов С.А., Купраш Д.В. Цитокины, их рецепторы и передача внутриклеточных сигналов. В кн.: *Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. С. 158–68. [Nedospasov S.A., Kuprash D.V. Cytokines, their receptors, and intracellular signal transfer. In: Carcinogenesis. D.G. Zaridze (ed.). Moscow: Medicine, 2004. Pp. 158–68. (In Russ.)]*
18. Gorovetz M., Baekelandt M., Berner A. et al. The clinical role of phospholipase A2 isoforms in advanced-stage ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;103(3):831–40.
19. Gelman I.H. The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development. *Front Biosci* 2002;7:d1782–97.
20. Zhang B., Wang J., Wang X. et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2014;513(7518):382–7.
21. Arkhipova K.A., Zborovskaya I.B. Microdomain-forming proteins of different families in common signal pathways. *Biologicheskie Membrany* 2013;29(6):387–99.
22. Глушанкова Н.А., Житняк И.Ю., Айолло Д.В., Рубцова С.Н. Роль E-кадгерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):12–7. [Gloushankova N.A., Zhitnyak I.Yu., Ayollo D.V., Rubtsova S.N. The role of E-cadherin in neoplastic evolution of epithelial cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):12–7. (In Russ.)].
23. Gupta R., Toufaily C., Annabi B. Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer. *Biochimie* 2014. pii: S0300–9084(14) 00259–4. doi: 10.1016/j.biochi.2014.09.010.
24. Santarpia L., Nicoloso M., Calin G.A. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocr Relat Cancer* 2010;17(1):51–75.
25. White N.M., Fatoohi E., Metias M. et al. Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(2):75–84.
26. Lee S.K., Calin G.A. Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov Med* 2011;11(58):245–54.
27. Takahashi R., Miyazaki H., Ochiya T. The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Front Genet* 2014;4:295. doi: 10.3389/fgene.2013.00295.
28. Gupta P.B., Chaffer C.L., Weinberg R.A. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 2009;15(9):1010–2.
29. Krutovskikh V., Partensky C. New insights in oncology: epigenetics and cancer stem cells. *Cancer Radiother* 2011;15(8):716–22.
30. Mannelli G., Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev* 2012;38(5):515–39.
31. Aushhev V.N., Zborovskaya I.B., Laktionov K.K. et al. Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2013;8(10):e78649. doi: 10.1371/journal.pone.0078649.
32. Ishida M., Selaru F.M. miRNA-based therapeutic strategies. *Curr Anesthesiol Rep* 2013;1(1):63–70.
33. Mäbert K., Cojoc M., Peitzsch C. et al. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *Int J Radiat Biol* 2014;90(8):659–77.
34. Volinia S., Nuovo G., Drusco A. et al. Pluripotent stem cell miRNAs and metastasis in invasive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(12). pii: dju324. doi: 10.1093/jnci/dju324.
35. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: Издательский дом СПбМАПО, 2007. 212 с. [Imaynitov E.N., Hanson C.P. Molecular oncology: clinical aspects. St. Petersburg: SPbMAPO Publishing House, 2007. 212 p. (In Russ.)]
36. Goode E.L., Ulrich C.M., Potter J.D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1513–30.
37. Timofeeva M.N., Hung R.J., Rafnar T. et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: meta-analysis of 14900 cases and 29485 controls. *Hum Mol Genet* 2012;21(22):4980–95.
38. Sosa M.S., Bragado P., Aguirre-Ghiso J.A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):611–22.
39. Suvà M.L., Riggi N., Bernstein B.E. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013;339(6127):1567–70.
40. Marjanovic N.D., Weinberg R.A., Chaffer C.L. Poised with purpose: cell plasticity enhances tumorigenicity. *Cell Cycle* 2013;12(17):2713–9.

41. Красильников М.А., Щербakov А.Н. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):18–26. [Krasil'nikov M.A., Shcherbakov A.M. Estrogen-dependent signaling pathways and their role in the tumor progression: progress and perspectives. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):18–26. (In Russ.)].
42. Сергеева Н.С., Маршутина Н.В., Солохина М.П. и др. Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):69–80. [Sergeeva N.S., Marshutina N.V., Solokhina M.P. et al. Modern conceptions of serological tumor markers and their role in oncology. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):69–80. (In Russ.)].
43. Denholm R., Schüz J., Straif K. et al. Is previous respiratory disease a risk factor for lung cancer? *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190(5):549–59.
44. Taioli E., Gaspari L., Benhamou S. et al. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiol* 2003;32(1):60–3.
45. Fidler I.J. Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2012;8(8):1141–2.
46. Zborovskaya I., Gasparian A., Karseladze A. et al. Somatic genetic alterations (LOH) in benign, borderline and invasive ovarian tumours: intratumoral molecular heterogeneity. *Int J Cancer* 1999;82(6):822–6.
47. Gupta P.B., Fillmore C.M., Jiang G. et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146(4):633–44.
48. Подгорный О.В., Лазарев В.Н., Говорун В.М. Лазерная микродиссекция в биологии и медицине. *Цитология* 2012;54(5):381–9. [Podgorniy O.V., Lazarev V.N., Govorun V.M. Laser dissection in biology and medicine. *Tsitologiya = Cytology* 2012;54(5):381–9. (In Russ.)]
49. van Dam E.M., Robinson P.J. Ral: mediator of membrane trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(11):1841–7.
50. Xiong J., Liu J., Rayner S. et al. Protein-protein interaction reveals synergistic discrimination of cancer phenotype. *Cancer Inform* 2010;9:61–6.
51. Neumann J., Wehweck L., Maatz S. et al. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Arch* 2013;463(4):509–23.
52. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике. Успехи молекулярной онкологии 2014;(1):27–35. [Gershtein E.S., Kushlinsky N.E. Growth factors, their receptors and down-stream signaling proteins in human tumors: from experiment to clinical practice. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2014;(1):27–35. (In Russ.)].
53. George K.S., Wu S. Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;259(3):311–9.
54. Chowdhury I., Thompson W.E., Thomas K. Prohibitins role in cellular survival through Ras–Raf–MEK–ERK pathway. *J Cell Physiol* 2014;229(8):998–1004.
55. Sotgia F., Martinez-Outschoorn U.E., Howell A. et al. Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu Rev Pathol* 2012;7:423–67. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811–120856.
56. Arkhipova K.A., Sheyderman A.N., Laktionov K.K. et al. Simultaneous expression of flotillin-1, flotillin-2, stomatin and caveolin-1 in non-small cell lung cancer and soft tissue sarcomas. *BMC Cancer* 2014;14:100. doi: 10.1186/1471-2407-14-100.
57. Andreu Z., Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 2014;5:442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
58. Kaplan R., Raffi S., Lyden D. Preparing the “soil”: the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006;66(23):11089–93.
59. Pant S., Hilton H., Burczynski M.E. The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochem Pharmacol* 2012;83(11):1484–94.
60. Braicu C., Tomuleasa C., Monroig P. et al. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death Differ*. 2014. doi: 10.1038/cdd.2014.130.
61. Brabender J., Marjoram P., Salonga D. et al. Expression analysis of a limited number of highly selected genes may have clinical usefulness for the treatment of patients with this disease. A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus. *Oncogene* 2004;23(27):4780–8.
62. Singhal S., Vachani A., Antin-Ozerkis D. et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11(11):3974–86.
63. Zhu C.Q., Shih W., Ling C. H., Tsao M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol* 2006;59(8):790–800.
64. Okayama H., Schetter A.J., Ishigame T. et al. The expression of four genes as a prognostic classifier for stage I lung adenocarcinoma in 12 independent cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014. pii: cebp. 0182.2014.
65. Юдин Д.И. Молекулярно-биологические особенности опухоли в индивидуальном прогнозировании результатов хирургического лечения немелкоклеточного рака легкого, Дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 126 с. [Yudin D.I. Molecular and biological peculiarities of tumors in individual prediction of results of surgical treatment of non-small cells lung cancer: Thesis ... of candidate of medical sciences. Moscow, 2005. 126 p. (In Russ.)]
66. Witta S.E., Gemmill R.M., Hirsch F.R. et al. Restoring e-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2006;66(2):944–50.
67. Witta S.E., Jotte R.M., Konduri K. et al. Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *J Clin Oncol* 2012;30(18):2248–55.
68. Imyanitov E.N. Ovarian cancer genome. *Methods Mol Biol* 2013;1049:3–7. doi: 10.1007/978-1-62703-547-7_1.
69. Iyevleva A.G., Mitiushkina N.V., Karaseva N.A. et al. Lung carcinomas with EGFR exon 19 insertions are sensitive to gefitinib treatment. *J Thorac Oncol*. 2014;9(4):e31–3.
70. Семглазова Т.Ю., Клименко В.А., Филатова Л.В. и др. Маркеры эффективности предоперационной таксаносодержащей химиотерапии местнораспространенного рака молочной железы. Вопросы онкологии 2013;59(3):363–7. [Semiglazova T.Yu., Klimenko V.A., Filatova L.V. et al. Markers of efficiency of preoperative taxane-containing chemotherapy of locally advanced breast cancer. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2013;59(3):363–7. (In Russ.)]
71. Городнова Т.В., Максимов С.Я., Гусейнов К.Д., Имянитов Е.Н. Оценка эффективности платиносодержащей химиотерапии у больных раком яичников носительниц мутаций в гене BRCA1. Вопросы онкологии 2014;60(3):339–42. [Gorodnova T.V., Maximov S.Ya., Guseinov C.D., Imyanitov E.N. Assessment of efficiency of platinum-containing chemotherapy of patients with ovarian carcinoma that carry mutations in the BRCA1 gene. *Voprosy onkologii = Oncology Issues* 2014;60(3):339–42. (In Russ.)]
72. Имянитов Е.Н. Меланома: от исследований молекулярного патогенеза к революции в лечении. Архив патологии 2013;75(5):63–72. [Imyanitov E.N. Melanoma: from research of molecular pathogenesis to revolution in therapy. *Arkhiv patologii = Pathology Archive* 2013;75(5):63–72. (In Russ.)]
73. Герштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Левкина Н.В. и др. Взаимосвязь экспрессии компонентов VEGF-сигнального пути и матричных металлопротеиназ в опухолях больных с новообразованиями яичников. Бюллетень экспериментальной

- биологии и медицины 2011;151(4):431–6. [Gerstein E.S., Kushlinskiy D.N., Levkina N.V. et al. Interconnection between expression of components of VEGF signal route and matrix metalloproteinases in tumors of patients with ovarian neoplasms. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2011;151(4):431–6. (In Russ.)]
74. Bogush T.A., Dudko E.A., Semakov A.V. et al. Immunofluorescent assay of ERCC1 and estimation of clinical significance of the protein expression in ovarian cancer tissue. *Dokl Biochem Biophys* 2014;457(1):141–5.
75. Emelyanova M., Arkhipova K., Mazurenko N. et al. Sensitive Genotyping of Somatic Mutations in the EGFR, KRAS, PIK3CA, BRAF Genes from NSCLC Patients Using Hydrogel Biochips. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014. [Epub ahead of print].
76. Demidova I., Barinov A., Savelov N. et al. Immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in patients with non-small cell lung cancer: potential advantages and methodologic pitfalls. *Arch Pathol Lab Med* 2014;38(6):794–802.
77. Blom R.L., Bogush T., Brücher B.L. et al. Therapeutic approaches to gastroesophageal junction adenocarcinomas. *Ann NY Acad Sci* 2014;1325(1):197–210.
78. de Thé H., Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer* 2010;10(11):775–83.
79. Grosse-Gehling P., Fargeas C.A., Dittfeld C. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol* 2013;229(3):355–78.
80. Roudi R., Madjd Z., Korourian A. et al. Clinical significance of putative cancer stem cell marker CD44 in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Biomark* 2014;14(6):457–67. doi: 10.3233/CBM-140424.
81. Bertolini G., Roz L., Perego P. et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(38):16281–6.
82. Sun Q.L., Sha H.F., Yang X.H. et al. Comparative proteomic analysis of paclitaxel sensitive A549 lung adenocarcinoma cell line and its resistant counterpart A549-Taxol. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(3):521–32.
83. Alamgeer M., Ganju V., Kumar B. Changes in aldehyde dehydrogenase-1 expression during neoadjuvant chemotherapy predict outcome in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;16(2):R44. doi: 10.1186/bcr3648.
84. Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells *in vitro*. *Cell Commun Signal* 2013;11:88. doi: 10.1186/1478-811X-11-88.
85. Ling H., Fabbri M., Calin G.A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews. Drug Discov* 2013;12(11):847–65.
86. Li S., Liang Z., Xu L., Zou F. MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Mol Cell Biochem* 2012;360(1–2):147–58.
87. Shevchenko V., Kovalev S., Arnotskaya N. et al. Human blood plasma proteome mapping for search of potential markers of the lung squamous cell carcinoma. *Eur J Mass Spectrometry* 2013;19(2):123–33.
88. Bridge J.A., Cushman-Vokoun A.M. Molecular diagnostics of soft tissue tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135(5):588–601.
89. Nookaew I., Papini M., Pornputtpong N. et al. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2012;40(20):10084–97.
90. Marjanovic N.D., Weinberg R.A., Chaffer C.L. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem* 2013;59(1):168–79.
91. Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006;34(Database issue):D140–4.
92. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D152–7.