

УДК 616-006-037:57.088

*Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, Л.К. Овчинникова, М.А. Дигаева, И.К. Воротников, М.И. Давыдов***БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ОПУХОЛЕЙ В КЛИНИКЕ – ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ**

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация:

Кушлинский Николай Евгеньевич, заведующий лабораторией клинической биохимии РОНЦ.

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе 24; **тел.** +7(495)324-11-79**e-mail:** biochimia@mtu-net.ru

Статья поступила: 26.05.2009 г., принята к печати: 23.09.2009 г.

Резюме

Биологические маркеры опухолей в клинике – достижения, проблемы, перспективы.

В обзоре на примере основополагающих данных современной литературы и результатов собственных многолетних исследований рассматриваются основные биологически значимые тканевые маркеры опухолей человека: рецепторы стероидных гормонов, факторы роста и нижележащие сигнальные белки, ассоциированные с опухолью протеазы, маркеры ангиогенеза. Проанализированы методические аспекты, достижения предклинических исследований, международные рекомендации по клиническому использованию этих показателей в прогнозировании течения заболевания и назначении эффективной терапии. Представлены также последние данные о возможностях и ограничениях использования современных высокопроизводительных технологий (микрочипов) в качестве альтернативы исследованию индивидуальных биологических маркеров.

Ключевые слова: биологические маркеры опухолей, рецепторы стероидных гормонов, факторы роста, рецепторы факторов роста, протеинкиназы, опухоль-ассоциированные протеазы, маркеры ангиогенеза, микрочипы.

*N.E. Kushlinsky, E.S. Gershtein, L.K. Ovchinnikova, M.A. Digaeva, I.K. Vorotnikov, M.I. Davydov***THE TUMOR BIOLOGICAL MARKERS IN THE CLINIC – ACHIEVEMENTS, PROBLEMS, PROSPECTS**

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow

Abstract

The main biologically significant human tumor tissue markers (steroid hormone receptors, growth factors and downstream signaling proteins, tumor-associated proteases, angiogenic markers) are reviewed based on the background contemporary publications and the results of long-term personal research. Methodic aspects, achievements of pre-clinical studies, and international recommendations on clinical implications of these parameters in disease prognosis and effective treatment choice are represented. The recent data on the possibilities and pitfalls of the usage of modern high throughput technologies (microarrays) as an alternative to the determination of individual biological markers are analyzed.

Key words: tumor biological markers, steroid hormone receptors, growth factors, growth factor receptors, protein kinases, tumor-associated proteases, angiogenic markers, microarrays.

Введение

Биологические (тканевые, клеточные или молекулярные) маркеры характеризуют индивидуальные особенности опухоли, специфику ее «биологического поведения» и регуляции.

Количество показателей, рассматривающихся в качестве потенциальных биомаркеров и проходящих более или менее масштабные предклинические исследования, увеличивается лавинообразно, отражая достижения и находки в области изучения механизмов проявления фундаментальных свойств опухолевых клеток, таких как метастазирование и инвазия, неограниченная пролиферация, способность противостоять апоптозу, а также их чувствительность к экзогенным и эндогенным регуляторам.

В табл. 1 представлен далеко не полный перечень показателей, являющихся действующими или потенциальными биологическими маркерами опухолей.

В их число входят:

- онкогены и протоонкогены;
- онкобелки;

- различные факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки (все они часто являются продуктами различных онкогенов);
- рецепторы стероидных и пептидных гормонов;
- супрессорные гены и продукты их экспрессии;
- гормонозависимые белки;
- протеазы, участвующие в процессах метастазирования, инвазии и ангиогенеза;
- белки, отвечающие за межклеточные контакты, и т.д.

Методологически в качестве биологического маркера может рассматриваться и изменение числа копий соответствующего гена или его мутация, и изменение уровня экспрессии гена (мРНК), и изменение количества синтезируемого белка или его функциональной активности, измеренной в строго контролируемых условиях. В связи с этим для определения биологических маркеров может быть использован весь арсенал методов современной молекулярной биологии, биохимии и иммунохимии.

Определение любого биологического маркера может иметь два практических результата:

- 1) выявление среди больных ранними стадиями, не подлежащих адъювантной терапии по другим клиническим и лабораторным показаниям, пациентов подгруппы с повышенным риском рецидивирования и/или метастазирования, требующих немедленного адъювантного лечения или более тщательного наблюдения;
- 2) оценка чувствительности опухоли к определенным видам терапии и индивидуализация схем адъювантного лечения больных с распространенным процессом.

В последнее время одним из важнейших практических результатов изучения молекулярно-биологических характеристик опухолей становится разработка новых препаратов, направленно воздействующих на эти молекулы и блокирующих регулируемые ими процессы.

Поскольку количество биологических маркеров, для которых в клинко-лабораторных исследованиях продемонстрирована потенциальная практическая значимость, очень велико, а стоимость и трудоемкость их определения весьма значительны, необходимы четкие критерии, позволяющие рекомендовать каждый конкретный показатель для практического применения [19]. Основные условия включения маркера в схему обследования больного и использования результатов его определения для выбора лечения:

- 1) определение маркера должно приводить к более благоприятным результатам лечения – увеличению безрецидивной или общей выживаемости, и/или улучшению качества жизни, и/или снижению стоимости лечения;
- 2) эти преимущества должны иметь I уровень доказательности – доказательства получены либо в специальном масштабном рандомизированном проспективном исследовании, либо в результате мета-анализа значительного числа относительно небольших исследований;
- 3) необходимы стандартизованные воспроизводимые методы с четко обозначенными критериями, а также наличие внутренних и внешних программ контроля качества.

Этим условиям удовлетворяют очень немногие маркеры, поэтому количество показателей, реально используемых и рекомендуемых международными организациями для обследования онкологических больных, ограничено.

В лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН на протяжении многих лет проводится предклиническое исследование и при необходимости рутинное определение целого ряда маркеров, принадлежащих к различным биологически значимым подгруппам [6].

Рецепторы стероидных гормонов – критерий чувствительности к эндокринной терапии

Первым прочно вошедшим в клиническую практику биологическим маркером стали рецепторы стероидных гормонов – белки, специфически и избирательно связывающие соответствующие стероиды после их проникновения в клетку и опосредующие их биологические эффекты. Определение рецепторов стероидных гормонов используется для оценки гормональной чувствительности опухолей, в первую очередь, РМЖ, а также рака предстательной железы и рака эндометрия, что позволяет су-

щественно повысить эффективность эндокринной терапии у рецепторположительных больных и избавить пациентов с заведомо нечувствительными рецепторотрицательными опухолями от ненужных, травматичных (овариэктомия) или обладающих побочными эффектами (препараты) воздействий.

Помимо изучения традиционно гормонозависимых опухолей, перечисленных выше, нами был проведен радиолигандным методом скрининг рецепторного статуса различных злокачественных новообразований – сарком костей, меланомы, рака яичников, легкого, гортани, желудка, толстой кишки, почки, лейкозных клеток и лимфосарком – с целью выявления возможности включения в схемы их лечения эндокринной терапии [17]. Практически при опухолях всех локализаций был выявлен определенный процент новообразований, содержащих рецепторы того или иного класса стероидных гормонов (эстрогенов, прогестинов, андрогенов или глюкокортикоидов), а в ряде случаев (остеогенная саркома, рак яичников, лимфолейкоз) было продемонстрировано прогностическое значение рецепторного статуса для безрецидивной и/или общей выживаемости больных. Тем не менее, мировой опыт свидетельствует о низкой эффективности гормонотерапии при вышеперечисленных новообразованиях, и только при раке молочной железы исследование рецепторов эстрогенов и прогестерона является обязательным по международным рекомендациям для всех первичных больных. Необходимость определения рецепторного статуса РМЖ для назначения эндокринной терапии была подтверждена мета-анализом, включавшим 37000 больных, участвовавших в 55 рандомизированных исследованиях.

Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки – показатель способности опухоли к автономному росту

Чувствительность к эндокринным стимулам свойственна, как правило, опухолям с достаточно высокой степенью дифференцировки, сохраняющим определенную зависимость от регуляторных воздействий со стороны организма или от внешних стимулов. Между тем, одной из фундаментальных особенностей высокозлокачественных опухолей является способность к неограниченному автономному росту. В основе этого свойства лежат эффекты факторов роста – белков или полипептидов, продуцируемых опухолевыми клетками или другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиоцитами) и взаимодействующих со специфическими рецепторами на поверхности клеток-продуцентов или соседних клеток, стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление.

Наиболее изученным и клинически реализованным является механизм действия сигнальной системы рецептора эпидермального фактора роста и родственных ему рецепторов семейства c-erbB или HER. В это семейство входят четыре белка – собственно РЭФР (ErbB-1, HER1), а также ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) – сходные по структуре трансмембранные рецепторы, внутриклеточная часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Известно довольно много лигандов рецепторов семейства c-erbB, наиболее известными из них являются эпидермальный и α -трансформирующий факторы роста, амфирегулин и *cripto*, взаимодействующие только с РЭФР, а также херегулины (неурегулины), взаимодействующие с ErbB-3 и ErbB-4 [35]. Ни одного лиганда, взаимодействующего с рецептором ErbB-2 (HER2/neu), до настоящего времени не обнаружено.

Многими исследователями, в том числе, и в нашей лаборатории, было показано, что наличие в опухоли молочной железы классического РЭФР (HER1), в особенности, в отсутствии рецепторов стероидных гормонов, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе заболевания даже на ранних стадиях и о резистентности к эндокринной терапии [7; 14]. Тем не менее, из-за неоднозначности результатов, полученных разными авторами, определение РЭФР не вошло в рутинную клиническую практику в качестве маркера общего прогноза или гормоночувствительности РМЖ.

Помимо рака молочной железы, РЭФР выявляются в опухолях самых разных локализаций. Так, в серии работ, проведенных в конце прошлого и начале этого века радиолигандным методом с использованием ¹²⁵I-меченного ЭФР с последующим разделением на гидроксилатапате, являвшимся тогда международно принятым «золотым стандартом» определения РЭФР в мембранной фракции тканей, мы показали, что эти рецепторы присутствуют в 32-75% злокачественных опухолей (табл. 2). Чаще всего, они обнаруживались при НМРЛ, для которого было продемонстрировано также значительное снижение безрецидивной и общей выживаемости больных при уровне РЭФР >20 фмоль/мг белка [12]. И хотя в тот период реального практического применения эти данные не нашли, они приобретают новое значение в последнее время, когда на стадию клинических испытаний и практического использования вышли препараты, специфически воздействующие на РЭФР, – МКА к рецептору (Эрбитукс) и ингибиторы его внутренней тирозинкиназы (Иресса®, Тарцева™), реализующей первый этап передачи митогенного сигнала [5; 28]. Эти препараты уже рекомендованы для лечения НМРЛ [31], а также опухолей головы и шеи, колоректального рака и рака поджелудочной железы [5]. В то же время исследования самых последних лет свидетельствуют о том, что чувствительными к анти-РЭФР направленным препаратам (в частности, к ингибиторам тирозинкиназы) являются не все рецепторположительные опухоли, а только те, в которых имеется делеционная мутация L858R в тирозинкиназном домене гена РЭФР (примерно 5% курящих и 40% некурящих РЭФР⁺-больных НМРЛ) [41]. В связи с этим на повестку дня встает вопрос о тестировании этой мутации у РЭФР-положительных больных НМРЛ в качестве необходимого дополнительного критерия чувствительности к данным молекулярно-направленным препаратам [45].

Огромный прорыв в области практического использования маркеров, связанных с РЭФР-зависимой регуляцией роста опухолей, произошел после появления препарата Герцептин, представляющего собой гуманизированные МКА к рецептору 2 типа (HER2/neu) – уникальному представителю семейства, который, не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, является, тем не менее, ключевым звеном передачи митогенных сигналов всех ЭФР-подобных пептидов и необходим для успешного функционирования всей системы [18]. Ключевая роль HER2/neu объясняется тем, что основной особенностью всех трансмембранных рецепторных тирозинкиназ является необходимость димеризации для реализации киназной активности и последующих биологических эффектов, при этом после связывания активирующего лиганда рецепторы семейства ErbB могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, а наиболее активными являются гетероструктуры с участием рецептора HER2/neu.

Блокирование HER2/neu может существенно замедлить или остановить рост опухолей, зависящих от подобных стимулов, однако эффективное использование биологически активных препаратов предусматривает предварительную оценку индивидуальной чувствительности больных к данному виду лечения [38]. Общепринятым методом оценки чувствительности к Герцептину является использование ИГХ-окрашивания опухолевых тканей на белок HER2/neu с последующей оценкой амплификации *c-erbB-2* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в спорных случаях, когда ИГХ метод не дает строго положительного или строго отрицательного ответа. Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в лечении больных РМЖ, позволяя обеспечить максимальную эффективность Герцептина и избежать неоправданных затрат.

Что касается прогностического значения гиперэкспрессии или амплификации *c-erbB-2*, то, несмотря на гигантский материал (к настоящему времени в различных лабораториях мира обследовано уже несколько десятков тысяч больных РМЖ), единого мнения о прогностической ценности этого маркера до недавнего времени не было [19], однако с 2005 г. рекомендовано исследовать экспрессию (лучше – амплификацию) HER2/neu в числе других факторов для формирования групп риска среди больных ранними стадиями [27]. Есть также данные о том, что опухоли с амплифицированным геном HER2/neu слабо реагируют на эндокринную терапию, но чувствительны к последующей химиотерапии, при этом считается, что больным с HER2/neu-положительными опухолями следует рекомендовать более интенсивные режимы химиотерапии.

Наличие у HER-2/neu как внутри-, так и внеклеточной частей приводит к тому, что в процессе димеризации может происходить деградиация молекулы рецептора и миграция его внешнего домена в межклеточную среду. Эта особенность легла в основу разработки иммуноферментных систем для определения растворимого HER2/neu в сыворотке/плазме крови. Уже опубликованы результаты, свидетельствующие о перспективности этого теста, в первую очередь, для мониторинга эффективности лечения Герцептином [33]. Тем не менее, признается необходимость дальнейшего набора материала и выработки четких количественных критериев для реального использования сывороточных показателей. В исследовании, проведенном на 59 первичных больных РМЖ I-III стадии, мы показали, что уровень растворимого HER2/neu в сыворотке крови больных с опухолями, характеризующимися высокой экспрессией этого белка (2+/3+ по данным ИГХ) достоверно выше, чем у больных с низкой экспрессией HER2, а после удаления первичной опухоли уровень HER2/neu в сыворотке крови большинства больных снижается [16]. Эти предварительные данные свидетельствуют о том, что показатели сыворотки крови в определенной степени отражают уровень экспрессии HER2/neu в первичной опухоли и их определение может стать достаточно адекватным независимым методом мониторинга статуса HER2/neu как в до-, так и в послеоперационном периоде. Многочисленные клинические испытания Герцептина в различных схемах лечения рака молочной железы показали его высокую эффективность у больных с высокой экспрессией белка и/или амплификацией HER2/neu в опухоли [18; 38], однако оказалось, что существуют и пациенты, исходно резистентные к этому препарату, несмотря на положительный HER2-статус опухоли, а также достаточно часто и быстро (в течение 1 года) резистентность к Герцептину развивается в процессе лечения [36].

Таблица 1

Основные группы биологически значимых показателей, которые используются или могут быть использованы в качестве биологических маркеров опухолей

Биологическое значение	Маркеры
Показатели гормональной чувствительности	Рецепторы стероидных гормонов: РЭ, РП, РА, РГ
Показатели активности ауто/паракринальной регуляции пролиферации	Факторы роста и их рецепторы: рецепторы семейства c-erb (HER): РЭФР и его лиганды - ЭФР, α -ТФР, амфирегулин и др., HER2/neu; рецепторы инсулиноподобных факторов роста; рецепторы соматостатина
	Ферменты и белки, участвующие в передаче митогенных сигналов: рецепторные тирозинкиназы, МАП-киназы, PI3K, Akt, NFkB, STAT, Grb2 и др.
Показатели метастатической и инвазивной активности	Компоненты системы активации плазминогена: uPA, PAI-1, рецептор uPA, PAI-2, tPA
	Металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы
	Другие протеолитические ферменты
Показатели активности неоангиогенеза	Интегрины, кадгеринины
	VEGF A и его рецепторы 1 и 2 типа
	VEGF C и его рецептор
	Другие ангиогенные факторы: ФРФ, тимидинфосфорилаза, ФНО, интерлейкины и др.
	VEGF C и его рецептор
Регуляторы апоптоза	Другие ангиогенные факторы: ФРФ, тимидинфосфорилаза, ФНО, интерлейкины и др.
	Супрессорные гены и их продукты: p53, ген ретинобластомы
	Про- и антиапоптотические факторы: Fas-рецептор и Fas-лиганд, bcl-2, Akt, NFkB и др.
	Каспазы

Таблица 2

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

Локализация опухоли	n больных	%РЭФР ⁺ опухолей	Ссылки
Рак молочной железы	291	38	[7, 14]
Первичные опухоли костей	115	58	[13]
Рак эндометрия	58	32	[1]
Рак легкого	63	75	[12]
Рак яичников	52	54	[4]
Рак пищевода	19	63	[4]
Всего	598	47	—

Все это стимулировало интерес к изучению механизма действия этого препарата и поиску возможных причин исходной и приобретенной резистентности [5]. Процесс передачи сигнала большинства факторов роста в упрощенном виде можно представить как последовательное фосфорилирование или дефосфорилирование ряда трансмембранных и внутриклеточных белков, многие из которых сами обладают ферментативной активностью. Распространение сигнала происходит путем последовательных воздействий одного белка в цепочке на другой. Важнейшие внутриклеточные системы, участвующие в реализации эффектов различных факторов роста – это сигнальный путь, включающий фосфатидилинозитол 3-киназу (PI3K) и ее нижележащий эффектор серин/треониновую протеинкиназу Akt, а также Ras-Raf сигнальный каскад, включающий систему митоген-активируемых протеинкиназ.

Достаточно репрезентативные и многоплановые исследования указывают на то, что конститутивная активация Akt (протеинкиназы B) и, в целом, PI3K/Akt-сигнального пути является одним из ключевых механизмов резистентности HER2⁺-клеток к Герцептину и другим препаратам, направленным против рецепторов семейства РЭФР, а также может рассматриваться в качестве одного из механизмов

гормонорезистентности рецепторположительных опухолей [5; 25]. В связи с этим мы провели два исследования, в одном из которых методом иммунолоттинга была оценена экспрессия регуляторной p85 субъединицы PI3K [26], а в другом – иммуноферментным методом оценена экспрессия активированной (фосфорилированной по Ser473) Akt1 [24] в опухолях и прилежащих гистологически неизмененных тканях больных РМЖ. Оказалось, что активность этих двух компонентов одного сигнального каскада изменяется при малигнизации клеток молочной железы по-разному: в то время как экспрессия PI3K была увеличена в опухолях 79% больных и не зависела от основных клинико-морфологических факторов, включая статус рецепторов стероидных гормонов, Akt1 была активирована только в 49% опухолей, и частота ее активации положительно коррелировала с их размером и степенью злокачественности, была выше в РЭ⁺ РМЖ, чем в РЭ⁻, а соотношение со статусом РП было противоположным.

На основании этих результатов мы пришли к выводу о том, что, несмотря на кооперированную роль PI3K и Akt в регуляции роста и выживаемости клеток, их влияние на клиническое течение и гормональную или лекарственную чувствительность РМЖ может существенно различаться [25].

Ассоциированные с опухолью протеазы – показатель метастатического и инвазивного потенциала

Фундаментальным свойством злокачественных опухолей является способность к метастазированию и инвазии, важнейший механизм которых – разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами. Одно из ключевых мест в этих процессах занимает протеолитический каскад активации плазминогена в опухолевой ткани [20], а в многоступенчатой цепочке протеаз, ведущей к разрушению внеклеточного матрикса, ведущую роль играет активатор плазминогена урокиназного типа (uPA). Важную роль играет также находящийся на поверхности клеток рецептор uPA, поскольку при связывании с ним способность uPA активировать плазминоген увеличивается. В целом, процесс образования плазмина представляет собой циклическую амплификацию, регулируемую по механизму обратной связи. Помимо uPA в нем участвует также активатор тканевого типа (tPA), роль которого в опухолях противоположна и сводится к разрушению опухолевых клеток и защите окружающих тканей. Активность uPA и tPA подавляется двумя белковыми ингибиторами, принадлежащими к семейству серпинов, – PAI-1 и PAI-2. Считается, что при опухолевом росте они также играют разную роль: PAI-1 защищает опухолевые клетки от саморазрушения, а PAI-2 тормозит протеолитические процессы во внеклеточном матриксе. Различные компоненты системы активации плазминогена могут находиться как на самих опухолевых клетках, так и на фибробластах стромы, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах и макрофагах, эндотелиальных клетках, поэтому можно считать, что процесс активации плазминогена носит преимущественно паракринный характер. Уровень и соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена в опухолевой ткани может служить показателем метастатической и инвазивной активности опухоли, являясь вследствие этого биологически значимым фактором прогноза [20].

В достаточно репрезентативных и многочисленных исследованиях продемонстрирована высокая прогностическая значимость при РМЖ uPA и PAI-1. Многофакторный анализ свидетельствует о том, что они являются независимыми факторами прогноза, причем уже имеется доказательная база I уровня: это проспективное рандомизированное кооперированное исследование, включавшее около 600 больных ранними стадиями РМЖ [30], и объединенный многофакторный анализ данных 18 исследований групп, включавший в целом информацию о 8377 больных [32]. Оба исследования показали, что высокие уровни uPA и PAI-1 являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза, более значимыми, чем размер, степень злокачественности и рецепторный статус опухоли и возраст пациенток.

В связи с этим, их определение у больных ранними стадиями РМЖ уже могло бы быть рекомендовано для выявления подгрупп с повышенным риском рецидивирования и метастазирования, требующих более интенсивного лечения и наблюдения. Тем не менее, в настоящее время проводится кооперированное многоцентровое исследование «NNBC 3-Eurore» [37]. В него планируется вовлечь около 6000 пациенток, и по его результатам будет сделан окончательный вывод о целесообразности включения uPA и/или PAI-1 в алгоритм обязатель-

ного обследования первичных больных РМЖ без метастазов в лимфатические узлы.

Являясь биологически значимыми факторами прогноза при различных новообразованиях, компоненты системы активации плазминогена могут стать мишенями молекулярно направленных антиметастатических препаратов, а для оценки перспективности их использования в клинике необходимо выявить нозологические формы опухолей и группы больных, у которых можно ожидать наибольшего эффекта. Основываясь на этом, мы провели масштабное исследование роли uPA, PAI-1 и tPA при опухолях различных локализаций, включавшее более 900 больных. Его основные результаты опубликованы в обзоре [8] и сводятся к тому, что значительное и координированное увеличение содержания uPA и PAI-1 является практически универсальным свойством различных злокачественных опухолей, а соотношение экспрессии компонентов системы активации плазминогена с клинико-морфологическими особенностями и прогнозом заболевания зависит от типа опухоли. В связи с этим было высказано предположение о том, что uPA является перспективной и достаточно избирательной мишенью для антиметастатической терапии при многих злокачественных опухолях.

В то время как разработка препаратов, направленных против uPA или других компонентов системы активации плазминогена, остается пока лишь перспективным направлением молекулярно направленной терапии, протеазы, активация которых является конечным звеном в разрушении внеклеточного матрикса, инициированном плазминогеновым каскадом, – а именно, металлопротеиназы, уже стали мишенями препаратов, проходящих различные фазы клинических испытаний (Маримастат, Неовастат, Col-3, BMS-275291 и др.). Эти агенты рассматриваются сейчас не только как антиметастатические, но и как антиангиогенные препараты.

В проводимом в настоящее время исследовании спектра экспрессии различных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в опухолях больных раком толстой кишки, мы продемонстрировали, что эти новообразования характеризуются значительным и достоверным увеличением уровня MMP-2; 3; 7 и 13, а также TIMP-1 по сравнению с окружающими гистологически неизменными тканями [3; 23]. Следовательно, использование ингибиторов MMP при раке толстой кишки может оказаться весьма перспективным, тем более, что именно при этом заболевании достигнуты наибольшие успехи в области применения прямых антиангиогенными препаратами (Авастин).

Фактор роста эндотелия сосудов – показатель активности неоангиогенеза

Важную роль в регуляции опухолевой прогрессии играют факторы роста, стимулирующие развитие новых сосудов в опухоли – неоангиогенез [15; 22]. За последние 15 лет стало известно, что ключевым регулятором неоангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF/VEGF-A/VPF) [22] – белок, индуцирующий активный рост клеток эндотелия и формирование новых капилляров. Ряд фактов указывают на то, что VEGF не только обладает проангиогенной активностью, но может и непосредственно участвовать в регуляции пролиферации клеток опухоли. Об этом свидетельствуют, в частности, результаты работ, продемонстрировавших участие VEGF в регуляции выживаемости и пролиферации некоторых культивируемых *in vitro* опухолевых клеток [43].

Биологический эффект VEGF опосредуется его рецепторами VEGFR-1/Flt-1 и VEGFR-2/Flk-1/KDR, типичными рецепторными тирозинкиназами (трансмембранные гликопротеиды с молекулярной массой 170-235 kDa) [22].

Известно, что VEGF принимает участие в регуляции значительного числа внутриклеточных сигнальных путей как митогенных, так и антиапоптотических, в частности, нижележащими эффекторами VEGF являются белки, контролирующие апоптоз – Akt (протеинкиназа В) и Bcl-2 [22; 43].

В репрезентативных клинических исследованиях показано, что экспрессия VEGF при РМЖ имеет существенное значение для прогноза заболевания, а также влияет на чувствительность опухолей к гормональному и лекарственному лечению [15]. Его высокий уровень свидетельствует о неблагоприятном прогнозе – как при раннем, так и при распространенном РМЖ. В последние годы в литературе активно обсуждается также вопрос о роли сигнальных путей VEGF в клетках самого РМЖ.

По данным ряда авторов, уровень VEGF и его нижележащих эффекторов (VEGFR-1, VEGFR-2, PI3K, Akt, mTOR и др.) может иметь значение для прогноза выживаемости и чувствительности РМЖ к различным видам терапии. Кроме того, некоторые компоненты сигнального пути VEGF рассматриваются в настоящее время как перспективные мишени противоопухолевой терапии – особенно активно исследуются возможности подавления роста опухоли с помощью антител к VEGF (Авастин) и специфических ингибиторов тирозинкиназ VEGFR-1 и VEGFR-2 (например, Сутент).

Мы определили содержание VEGF, VEGFR-1 и VEGFR-2 в опухолях и гомологичных тканях 46 больных раком молочной железы [24]. Уровень VEGF и его рецепторов был достоверно повышен по сравнению с клетками окружающих гистологически неизмененных тканей молочной железы в 73-85% опухолей. Способность опухоли к повышенной продукции VEGF обнаружена уже на ранних стадиях заболевания.

Продемонстрирована также взаимосвязь компонентов VEGF-сигнального пути с показателями гормонозависимости: уровни VEGF и VEGFR-2 возрастали в опухолях с отрицательным статусом РП, при этом содержание VEGFR-2 достоверно коррелировало с уровнем РП. Кроме того, нам удалось показать, что тканевые концентрации VEGF и его рецепторов обоих типов в первичной опухоли достоверно положительно коррелируют между собой, что косвенно свидетельствовало об ауто/паракринной роли VEGF-сигнального пути при РМЖ. Это наблюдение было подтверждено и в последующем динамическом исследовании, проведенном у 30 больных местно-распространенным РМЖ, обследованных до и после проведения неoadьювантной химиолучевой терапии [11].

В этой работе мы показали также, что степень и направление изменений содержания VEGF и VEGFR2 в процессе предоперационной терапии зависели от исходных уровней данных белков, а их пост-лечебный уровень – от выраженности лечебного патоморфоза. Помимо РМЖ мы исследовали экспрессию VEGF в опухолях других локализаций – эндометрия, пищевода и желудка [2; 10].

Общими оказались положительная взаимосвязь тканевых уровней VEGF с показателями распространенности процесса, а также их прямая корреляция с содержанием uPA и PAI-1, что косвенно подтверждало участие этих компонентов системы активации плазминогена в неангиогенезе.

Попытки использовать показатели содержания VEGF в сыворотке или плазме крови в качестве адекватной замены тканевой экспрессии этого белка при оценке активности ангиогенеза и прогнозирования исхода РМЖ и/или эффективности терапии до настоящего времени не принесли большого успеха.

Так, в наших исследованиях корреляция тканевых и сывороточных концентраций VEGF либо отсутствовала, либо была слабой, при этом после удаления первичной опухоли уровень VEGF в крови снижался лишь у половины больных [9].

Современные высокотехнологичные подходы к исследованию комплекса биологических маркеров

Использование технологии микрочипов позволяет одновременно исследовать амплификацию, экспрессию или транскрипцию многих тысяч генов и создавать т.н. «молекулярные портреты» или «генные подписи» опухолей.

Появление таких высокотехнологичных методик с огромной пропускной способностью и высокой чувствительностью, позволяющей работать с очень небольшим количеством материала, должно в ближайшие годы произвести революцию в области исследования биологических маркеров.

К их недостаткам следует отнести, в первую очередь, сложность стандартизации исследований и интерпретации результатов одновременного определения большого числа различных показателей.

«Пионером» в этой области, как и в изучении и клиническом использовании практически всех индивидуальных биологических маркеров, является РМЖ. Только за последние два года опубликовано более 70 статей, посвященных возможности использования «профилей экспрессии генов» или молекулярных портретов РМЖ в клинике.

К настоящему времени разработано несколько систем классификации этого заболевания на основе «генных подписей» – ограниченного набора генов, позволяющих выделять подгруппы больных с различным прогнозом и чувствительностью к отдельным видам терапии [21; 29; 34; 39; 40; 42].

Оценка авторами клинической значимости собственных и чужих результатов колеблется от безоговорочного оптимизма, вплоть до предсказания «конца хирургической эры» в лечении РМЖ [42], до достаточно скептического анализа, подчеркивающего разнообразие и невоспроизводимость предложенных «подписей» и многочисленные методические трудности, возникающие при выполнении этих тонких методик и интерпретации их результатов [39].

В целом, ни одна из генных подписей не вошла пока в число международно признанных рекомендаций.

Лишь одна из наиболее известных систем [44], базирующаяся на анализе экспрессии 70 генов, проходит сейчас клинические испытания по международной программе Microarray for Node Negative Disease May Avoid ChemoTherapy (MINDACT) (EORTC 10041/ BIG 3-04: начало – сентябрь 2006 г.).

Заключение

Таким образом, благодаря успехам биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии, в настоящее время в арсенале исследователей и клиницистов имеется огромное количество биологически значимых показателей, которые могут помочь в прогнозе и выборе адекватной лечебной тактики и схем терапии различных злокачественных новообразований.

Тем не менее, большинство молекулярных маркеров пока еще прочно не вошли в рутинную практику, что определяется высокой стоимостью подобных исследований, сложностью интерпретации данных одновременного анализа многих прогностических факторов и недостаточным уровнем доказательности для большинства тестов. Для рутинного клинического использования международными организациями рекомендовано в настоящее время лишь несколько биологических маркеров РМЖ, эффективность и полезность которых имеет достаточно высокий уровень доказательности, а именно:

- 1) определение РЭ и РП у всех первичных больных для решения вопроса о целесообразности назначения эндокринной терапии;
- 2) оценка экспрессии (амплификации гена) HER2/neu у больных распространенным раком, если планируется лечение Герцептином, или у больных ранним раком для включения в комплекс прогностических факторов;

- 3) находятся в стадии окончательной оценки возможность определения опухолевой концентрации RAI-1 и/или uPA, а также одной из «генных подписей» для выявления группы с повышенным риском рецидивирования и метастазирования среди больных ранними стадиями. При опухолях других локализаций определение биологических маркеров ограничено лишь отдельными протоколами по клиническому изучению различных молекулярно направленных препаратов.

Следует подчеркнуть, что с приходом новых высокопроизводительных технологий, позволяющих одновременно в очень небольшом образце определять несколько десятков или даже тысяч показателей, особенно актуальны выбор оптимального набора информативных тестов, который позволил бы при минимально возможной стоимости обследования обеспечить максимальную эффективность лечения каждого больного, и разработка адекватных алгоритмов интерпретации результатов этого комплексного анализа.

Литература

1. Герштейн Е.С., Бочарова Л.Б., Ермилова В.Д. и соавт. Рецепторы эпидермального фактора роста и их лиганды в карциномах эндометрия: связь с клинико-морфологическими факторами и рецепторами стероидов. Вопросы онкологии // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46. – №2. – С. 180-6.
2. Герштейн Е.С., Грицаенко Е.В., Щербаков М.Е. и соавт. Фактор роста эндотелия сосудов и компоненты системы активации плазминогена при раке и гиперплазии эндометрия // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49. – №6. – С. 725-9.
3. Герштейн Е.С., Короткова Е.А., Щербаков А.М. и соавт. Матриксные металлопротеиназы 7 и 9 и их тканевые ингибиторы 1 и 4 типа в опухолях и плазме крови больных раком толстой кишки // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – №4. – С. 438-41.
4. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Клинические перспективы исследования рецепторов эпидермального фактора роста в опухолях человека // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. – №1. – С. 9-12.
5. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Современные представления о механизмах передачи сигналов факторов роста как основа эффективной молекулярно-направленной противоопухолевой терапии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – №1. – С. 4-9.
6. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы // Практическая онкология: избранные лекции. Под ред. С.А.Тюляндина и В.М. Моисеенко. «Центр ТОММ», С.-Петербург. – 2004. – С. 41-50.
7. Герштейн Е.С., Муавия М.А., Кушлинский Н.Е., Летягин В.П. Прогностическое значение определения рецепторов эпидермального фактора роста у больных раком молочной железы I-II стадии: результаты шестилетнего наблюдения // Вопросы онкологии. – 1998. – Т. 44. – № 4. – С. 383-9.
8. Герштейн Е.С., Талаева Ш.Ж., Сандыбаев М.Н., Кушлинский Н.Е. Клиническая роль системы активации плазминогена в опухолях человека // Молекулярная медицина. – 2007. – № 1. – С. 4-8.
9. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Алиева С.К. и соавт. Фактор роста эндотелия сосудов в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Т. 135. – №1. – С. 99-102.
10. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Гончаров Д.Ю. и соавт. Фактор роста эндотелия сосудов при раке пищевода // Вопросы биологической и фармацевтической химии. – 2004. – №1. – С. 26-9.
11. Ким Е.А., Герштейн Е.С., Субботина А.А. и соавт. Динамика экспрессии фактора роста эндотелия сосудов при различной неоадьювантной терапии рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2007. – №3. – С. 38-42.
12. Костылева О.И., Дыхно А.Ю., Герштейн Е.С. и соавт. Клиническое и прогностическое значение экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста при немелкоклеточном раке легкого // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1999. – Т.27. – №4. – С. 446-9.
13. Костылева О.И., Раоченко А.А., Герштейн Е.С. и соавт. Клиническое значение рецепторов эпидермального фактора роста и их лигандов при остеогенной саркоме // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1998. – №1. – С. 30-4.
14. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Рецепторы эпидермального фактора роста при раке молочной железы: от эксперимента к клинике // Бюлл. эксп. биол. мед. – 1998. – №11. – С. 485-96.
15. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2002. – Т. 133. – №6. – С. 604-12.
16. Кушлинский Н.Е., Широкий В.П., Герштейн Е.С. и соавт. Растворимый фрагмент рецептора HER2/neu в сыворотке крови больных раком молочной железы с разным уровнем экспрессии этого белка в опухоли // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2007. – Т. 143. – №4. – С. 427-30.
17. Рецепторы стероидных гормонов в опухолях человека. Под редакцией Л.С. Бассалык // М., Медицина, 1987. – 223 с.

18. De Laurentis M., Cancellato G., Zinno L. et al. Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology // *Ann. Oncol.* – 2005. – Vol. 16. – Suppl. 4. – iv7-iv13.
19. Duffy M.J. Predictive markers in breast and other cancers: a review // *Clinical Chemistry.* – 2005. – Vol. 51. – N3. – P. 494–503.
20. Duffy M.J., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualized management of patients with cancer // *Clin. Biochem.* – 2004. – Vol. 37. – P. 541-8.
21. Fan C., Oh D.S., Wessels L. et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355. – N6. – P. 560-9.
22. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – N6. – P. 669-76.
23. Gershtein E.S., Korotkova E.A., Scherbakov A.M. et al. Quantitative ELISA study of MMPs and TIMPs expression pattern in the tumors and plasma of colorectal cancer patients // *Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumor Biology.* – 2007. – N28(Suppl.1) – P. 83.
24. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Anurova O.A. et al. Phosphorylated Akt1 in human breast cancer measured by direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay: Correlation with clinicopathological features and tumor VEGF-signaling system component levels // *Int. J. Biol. Markers.* – 2006. – Vol. 21. – P. 12-9.
25. Gershtein E.S., Scherbakov A.M., Shatskaya V.A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinico-pathological correlations // *Anticancer Research.* – 2007. – Vol. 27. – N4A. – P. 1777-82.
26. Gershtein E.S., Shatskaya V.A., Kushlinsky N.E. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase expression in human breast cancer // *Clinica Chimica Acta.* – 1999. – Vol. 287. – P. 59-67.
27. Goldhirsch A., Glick J. H., Gelber R. D. & Panel Members Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005 // *Annals of Oncology.* – 2005. – Vol. 16. – P. 1569–83.
28. Harari P.M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2004. – Vol. 11. – N4. – P. 689-708.
29. Ioannidis J.P. Gene expression profiling for individualized breast cancer chemotherapy: success or not? // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2006. – Vol. 3. – N10. – P. 538-9.
30. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, et al. For the German Chemo No Study Group. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 // *J. Natl. Cancer Instit.* – 2001. – Vol. 93. – P. 913-20.
31. Langer C.J. Emerging role of epidermal growth factor receptor inhibition in therapy for advanced malignancy: focus on NSCLC // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58. – N3. – P. 991-1002.
32. Look M.P., van Putten W.L.J., Duffy M.J. et al. Pooled analysis of prognostic impact of tumor biological factors uPA and PAI-1 in 8377 breast cancer patients // *J. Natl. Cancer Instit.* – 2002. – Vol. 94. – P. 116-28.
33. Luftner D., Luke C., Possinger K. Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients // *Clin. Biochem.* – 2003. – Vol. 36. – N4. – P. 233-40.
34. Modlich O., Prisack H.B., Bojar H. Breast cancer expression profiling: the impact of microarray testing on clinical decision making // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2006. – Vol. 7. – N15. – P. 2069-78.
35. Moghal N., Sternberg P.W. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 11. – N2. – P. 190-6.
36. Nahta R., Esteva F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance // *Cancer Lett.* – 2006. – Vol. 232. – N2. – P. 123-38.
37. Persing M. M., Paepke D., Schmidt M. et al. on behalf of the NNBC-3 Study Group. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 for improved management in node-negative (N0) breast cancer: Experiences from the ongoing multicenter trial NNBC 3-Europe // *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).* – 2007. – Vol. 25. – N18S (June 20 Supplement). – P. 11081.
38. Plosker G.L., Keam S.J. Trastuzumab : a review of its use in the management of HER2-positive metastatic and early-stage breast cancer // *Drugs.* – 2006. – Vol. 66. – N4. – P. 449-75.
39. Puzstai L., Mazouni C., Anderson K. et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential // *Oncologist.* – 2006. – Vol.11. – N8. – P. 868-77.
40. Reis-Filho J.S., Westbury C., Pierga J.Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – Vol. 59. – N3. – P. 225-31.
41. Rosell R., Taron M., Reguart N. et al. Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – N24. – P. 7222-31.
42. Roukos D.H., Paraskevaidis E., Kappas A.M. Surgery in the era of gene expression profiling-based prediction and individualized, neoadjuvant breast cancer therapy: the beginning of the end? // *Ann. Surg. Oncol.* – 2006. – Vol. 13. – N3. – P. 433-5.
43. Ryden L., Stendahl M., Jonsson H. et al. Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up. Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2005. – Vol. 89. – N2. – P. 135-43.
44. Van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 347. – N25. – P. 1999-2009.
45. van Zandwijk N., Mathy A., Boerrigter L. et al. EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer // *Ann Oncol.* – 2007. – Vol. 18. – N1. – P. 99-103.