

Молекулярно-биологические факторы прогноза и эффективности лекарственного лечения при диссеминированном раке почки

Д.А. Носов¹, Е.С. Яковлева¹, Д.А. Атаева¹, Л.Н. Любченко², С.А. Тюлядин¹

¹Отделение клинической фармакологии и химиотерапии;

²Лаборатория клинической онкогенетики ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Дмитрий Александрович Носов nosov@mail.ru

Существенное улучшение результатов лечения пациентов с диссеминированными формами почечно-клеточного рака (ПКР) связано с активным использованием в клинической практике таргетных препаратов, оказывающих действие на молекулярно-генетические механизмы, которые лежат в основе развития данного заболевания. Одним из ранних и ключевых событий в канцерогенезе при светлоклеточном варианте ПКР считается инактивация VHL-гена и/или наличие нарушений, которые связаны с другими элементами сигнального пути, регулирующего процессы пролиферации и неоангиогенеза в опухолевой ткани (mTOR – mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина в клетках млекопитающих, HIF – hypoxia-induced factor – индуцируемый гипоксией фактор, VEGF/VEGFR – vascular endothelial growth factor – сосудисто-эндотелиальный фактор роста и его рецептор, PDGFR – platelet-derived growth factor receptor – рецептор тромбоцитарного фактора роста, CA IX – карбоангидраза IX). Однако в настоящее время нет единого мнения о прогностической значимости данных нарушений и их влиянии на эффективность лекарственного лечения. Результаты проведенных клинических исследований, в которых оценивали потенциальные молекулярно-биологические маркеры, выглядят противоречивыми. Это может объясняться как разнородными клиническими характеристиками больных, так и различными методологическими подходами в оценке тех или иных молекулярных нарушений. Также существуют другие альтернативные сигнальные пути и механизмы, ответственные за формирование первичной или вторичной лекарственной резистентности при использовании таргетных агентов. Таким образом, проблема поиска потенциальных биомаркеров остается по-прежнему актуальной. В данной статье приводится анализ результатов доступных на сегодняшний день клинических исследований, в которых изучалась роль различных биологических маркеров в прогнозировании эффективности современных лекарственных подходов в лечении у больных ПКР.

Ключевые слова: рак почки, таргетная терапия, мутация VHL-гена, экспрессия индуцируемого гипоксией фактора, сосудисто-эндотелиальный фактор роста, биомаркеры

Molecular biological factors of prognosis and efficiency of medical treatment for disseminated renal cell carcinoma

D.A. Nosov¹, E.S. Yakovleva¹, D.A. Atayeva¹, L.N. Lyubchenko², S.A. Tyulyandin¹¹Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy;²Laboratory of Clinical Oncogenetics, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The substantial improvement of treatment results in patients with disseminated forms of renal cell carcinoma (RCC) is associated with the active clinical application of target drugs that affect the molecular genetic mechanisms underlying the development of this disease. Inactivation of the VHL gene and/or the disorders related to other elements of the signaling pathway regulating the processes of proliferation and neoangiogenesis in tumor tissue (mammalian target of rapamycin; hypoxia-induced factor; vascular endothelial growth factor and its receptor; platelet-derived growth factor receptor; and carbonic anhydrase IX) are considered to be one of the early and key events in carcinogenesis in clear cell RCC. However, there is presently no consensus of opinion as the prognostic value of these disorders and their impact on the efficiency of drug therapy. The results of the clinical trials assessing potential molecular biological markers are discordant. This is attributable both to the dissimilar clinical characteristics of patients and different methodological approaches to evaluating these or those molecular impairments. There are also other alternative signaling pathways and mechanisms responsible for the formation of primary or secondary drug resistance when target agents are administered. Thus, the quest of potential biomarkers remains an urgent problem as before. This paper analyzes the results of the currently available clinical studies of the role of various biological markers in predicting the efficiency of the present-day medicinal approaches to treating patients with RCC.

Key words: renal cell carcinoma, target therapy, VHL gene mutation, hypoxia-induced factor, vascular endothelial growth factor, biomarkers

На долю наследственных вариантов приходится не более 1–2% всех случаев рака почки (РП). Однако именно благодаря изучению генетических причин, лежащих в основе возникновения наследственного синдрома Гиппеля–Линдау (von Hippel–Lindau — VHL), существенно расширились представления о молекулярных механизмах, ответственных за развитие спорадических форм почечно-клеточного рака (ПКР). Синдром VHL — редкая патология, характеризующаяся аутосомно-доминантным типом наследования и обусловленная инактивацией одноименного супрессорного гена (*3p25*) вследствие возникновения его герминальной мутации. При данном синдроме с различной частотой могут наблюдаться гемангиобластоз сетчатки и/или центральной нервной системы, феохромоцитома, поликистоз поджелудочной железы, цистаденома придатков яичка, рак поджелудочной железы и светлоклеточный вариант РП. При этом у носителей герминальной мутации *VHL*-гена вероятность развития ПКР в течение жизни крайне высока и может достигать 60% [1–3].

При спорадических формах светлоклеточного ПКР (сПКР), являющегося доминирующим (70–80% случаев) гистологическим вариантом ПКР, также наблюдается инактивация *VHL*-гена, но уже вследствие развития соматических мутаций или метилирования промотора данного гена, которые, по данным разных авторов, имеют место в 30–70 и 5–10% наблюдений соответственно. При других гистологических вариантах ПКР (папиллярный, хромофобный и тубулярный рак) мутации *VHL*-гена не выявлены. Была выдвинута гипотеза, что нарушение активности *VHL*-гена и контролируемых им внутриклеточных сигнальных путей является одним из ранних и ключевых событий в канцерогенезе при сПКР [4–7]. В физиологических условиях белковый продукт (*pVHL*) *VHL*-гена, который по природе своей является

геном-супрессором, обеспечивает внутриклеточную регуляцию уровня транскрипционного фактора HIF-1–2α (hypoxia-induced factor — индуцируемый гипоксией фактор) посредством связывания с HIF и осуществления его инактивации. При развитии гипоксии функциональная активность *VHL*-гена снижается, что приводит к внутриклеточной аккумуляции HIF и последующей стимуляции генов, ответственных за синтез сосудисто-эндотелиального (VEGF — vascular endothelial growth factor), тромбоцитарного (PDGF — platelet-derived growth factor) и трансформирующего (TGFα — transforming growth factor-α) факторов роста, а также карбоангидразы IX (CA IX) и ряда других факторов, которые позволяют клетке временно адаптироваться к гипоксии. При опухолевой трансформации и инактивации *VHL*-гена продуцируемые опухолевыми клетками в большом количестве факторы роста (VEGF и PDGF) являются мощными стимуляторами опухолевого неоангиогенеза. Клетки эндотелия и их предшественники — фибробласты и перициты — имеют на своей поверхности рецепторы к данным факторам роста. VEGF и PDGF, воздействуя на эти рецепторы, способствуют мобилизации циркулирующих предшественников эндотелиальных клеток из сосудистого русла, улучшению их выживаемости, активации с последующей пролиферацией и формированием сосудистой сети внутри самой опухоли. В одном из исследований была продемонстрирована четкая корреляция между *VHL*-мутацией, гиперэкспрессией HIF-1α и гиперпродукцией VEGF в опухолевой ткани у больных сПКР [8]. Таким образом, молекулярные нарушения, возникающие на различных этапах *VHL*-зависимого сигнального пути, могут, с одной стороны, объяснять избыточную опухолевую васкуляризацию при ПКР, а с другой — обосновывать использование ингибиторов ангиогенеза в лечении данного заболевания. Также

можно предполагать, что инактивация *VHL*-гена имеет прогностическую значимость и может предсказывать эффективность тех или иных лекарственных подходов, использующихся при терапии ПКР.

Мутация *VHL*-гена и экспрессия HIF

Влияние инактивации *VHL*-гена в результате соматических мутаций или метилирования промотора гена на прогноз больных сПКР и их связь с важнейшими клиническими характеристиками изучали в нескольких ретроспективных исследованиях, результаты которых противоречивы. Несмотря на то что в одном из первых исследований была продемонстрирована корреляция между размером первичной опухоли и нарушением в структуре *VHL*-гена [9], в большинстве последующих исследований данное наблюдение не нашло своего подтверждения. В результате не выявлено четкой зависимости между наличием изменений в *VHL*-гене и такими клинико-морфологическими показателями, как стадия опухоли, степень ее дифференцировки и пролиферативная активность [10, 11]. В более ранних работах было выдвинуто предположение, что не все генетические дефекты сопровождаются полной потерей функции гена, а лишь те, в результате которых существенно страдает процесс транскрипции данного гена. К таким нарушениям, как правило, относят делецию, инсерцию гена, нонсенс мутации или гиперметилирование, которые считаются функционально значимыми, т. е. инактивирующими.

По данным К. Kondo и соавт. [12], различные варианты *VHL*-мутаций были обнаружены у 104 (51%) из 202 больных сПКР, еще у 11 (5%) наблюдалось гиперметилирование промотора *VHL*-гена. Частота мутаций не повышалась при увеличении размера первичной опухоли, поражении регионарных лимфатических узлов или при наличии отдаленных метастазов. Даже в первичных опухолях размером < 2,5 см достаточно часто (63% наблюдений) выявляли *VHL*-мутации. Практически во всех (97%) случаях одновременно с мутацией обнаруживали потерю гетерозиготности (ЛОН), произошедшую в результате аллельной делеции локуса *3p25* хромосомы. Из 104 мутаций 48% были локализованы в 1-м экзоне, 21 и 31% — в 3-м и 2-м экзонах соответственно. В 47% случаев имели место делеции, в 30% — миссенс-мутации, в 17% — инсерции, в 6% — нонсенс-мутации. Таким образом, наличие инактивирующих мутаций было установлено у 84 (73%) из 115 больных с тем или иным типом *VHL*-нарушений.

В нескольких исследованиях наличие *VHL*-мутации ассоциировалось с улучшением выживаемости больных с локальными формами сПКР после выполнения радикальной нефрэктомии. В своей работе М. Yao и соавт. [13] проанализировали влияние нарушений в *VHL*-гене (мутации и гиперметилирование) на безрецидивную и общую выживаемость 187

больных с I–IV стадиями сПКР. Наблюдалась одинаковая частота развития мутаций (52% случаев) или гиперметилирования (5%) при различных стадиях заболевания. При многофакторном анализе данные нарушения являлись благоприятным прогностическим фактором у 134 пациентов с локальными (I–III) стадиями болезни. С увеличением стадии прогностическая значимость *VHL*-нарушений возрастала. При II стадии ($n=14$) прослеживалась лишь тенденция к улучшению безрецидивной выживаемости больных после радикальной нефрэктомии, а в группе пациентов с III стадией ($n=46$) зарегистрировано достоверное повышение безрецидивной выживаемости с 63 до 133 мес при наличии функционально значимых изменений в *VHL*-гене. При этом в 70% случаев, в основном при III стадии заболевания, больным проводили адъювантную иммунотерапию с включением интерферона α (ИФНа). В том же исследовании у 53 пациентов с IV стадией не было выявлено влияния *VHL*-изменений на общую выживаемость. Авторы не приводят данных об эффективности иммунотерапии, времени до прогрессирования болезни и связи этих показателей с *VHL*-мутацией в данной подгруппе пациентов.

В другом исследовании наличие *VHL*-мутации было диагностировано у 58 (58%) из 100 больных с различными стадиями сПКР [14]. В группе больных, имевших данные генетические нарушения, время до прогрессирования болезни было достоверно длиннее, а также просматривалась тенденция к улучшению показателей общей выживаемости. Тем не менее при проведении многофакторного анализа наличие *VHL*-мутации утратило свою прогностическую значимость. К сожалению, авторы не приводят данных о влиянии этого показателя на безрецидивную выживаемость в зависимости от стадии заболевания, а также на результаты лечения 46 пациентов с IV стадией.

По результатам еще одного исследования, в которое было включено 185 больных сПКР, частота возникновения мутаций и гиперметилирования, ассоциированных с потерей функции *VHL*-гена, достигала 63% [15]. При этом у пациентов с IV стадией болезни ($n=32$) мутации наблюдались несколько реже — лишь в 19% случаев. При медиане времени наблюдения 6 лет не выявлено четкой связи между нарушением функции *VHL*-гена и прогнозом больных как во всей группе, так и при стратификации пациентов в зависимости от стадии. На общую выживаемость значимое влияние оказывали только стадия заболевания и степень анаплазии опухоли. Авторами не приведены данные о методах лекарственного лечения, эффективности иммунотерапии и их связи с выявленными молекулярными нарушениями из-за небольшого числа пациентов с поздними (N+ и M1) стадиями болезни. С другой стороны, вряд ли можно было ожидать корреляции между данными

параметрами, поскольку в целом эффективность цитокинотерапии на тот момент не превышала 10–15%, а группа больных с IV стадией была крайне немногочисленной.

В работе, представленной P. Shraml и соавт. [10], наличие инактивирующих мутаций зарегистрировано всего у 19 из 113 больных сПКР I–IV стадии. Данные об общей выживаемости были доступны в отношении 83 больных, для которых наличие *VHL*-мутации являлось негативным прогностическим фактором. Однако при проведении многофакторного анализа прогностическая значимость данного параметра была утрачена, а независимыми факторами прогноза являлись только стадия заболевания и степень опухолевой анаплазии. В данном исследовании также не представлен анализ больных с отдаленными метастазами (M1), по-видимому, в связи с наличием небольшого числа пациентов с IV стадией и низкой частоты выявляемых мутаций.

Таким образом, на сегодняшний день очевидно, что *VHL*-нарушения свойственны только сПКР и являются ранним генетическим событием в канцерогенезе. Пока нет единого мнения о прогностической значимости генетических нарушений в *VHL*-гене. Это обусловлено тем, что анализируемые группы больных были слишком разнородны по своим клиническим характеристикам, стадиям и методам определения инактивирующих мутаций, но создается впечатление, что данное молекулярное нарушение сочетается с относительно благоприятным течением заболевания. Наличие крайне ограниченного числа больных с IV стадией, включенных в эти исследования, также не позволяет пока сделать какие-либо однозначные выводы о влиянии *VHL*-мутации на эффективность проведенного лечения и общую выживаемость при распространенных стадиях заболевания. Тем не менее теоретически *VHL*-нарушения могут являться фактором, предсказывающим эффективность терапии ИФН, которые обладают не только иммуномодулирующим, но и антиангиогенным свойством. Более того, в представленных выше исследованиях анализ выживаемости больных проводился еще до активного использования в клинической практике таргетных лекарственных подходов, которые в большинстве своем благодаря воздействию на различные элементы *VHL*/HIF-ассоциированного сигнального пути оказались более эффективными, чем иммунотерапевтические методы. Соответственно, необходимость в идентификации молекулярных маркеров, предсказывающих противоопухолевую активность ингибиторов ангиогенеза при сПКР, стала ощущаться еще более остро.

B.I. Rini и соавт. [16] изучили эффективность применения анти-VEGF/VEGFR-терапии у 43 пациентов с диссеминированными формами сПКР в зависимо-

сти от наличия в опухолевой ткани инактивирующих мутаций *VHL*-гена. Комбинацию ИФН + бевацизумаб, монотерапию сунитинибом или акситинибом использовали для лечения 8 (19%), 11 (25%) и 24 (56%) пациентов соответственно. Частота достижения полных и частичных регрессий для всей группы составила 43%, общая частота выявления *VHL*-мутаций – 60% ($n=25$), еще у 1 больного отмечено метилирование *VHL*-гена. При этом у 16 (37%) пациентов генетические нарушения носили функционально значимый характер, и именно в данной подгруппе наблюдалась тенденция к увеличению времени до прогрессирования болезни с 7,4 до 13,3 мес ($p=0,06$). Анализ, в котором была бы проведена оценка корреляции между частотой достижения опухолевых регрессий и типом мутации, ее локализацией или функциональной значимостью, был затруднен в связи с небольшим числом наблюдений и разнородностью группы больных с точки зрения используемых антиангиогенных препаратов. Позднее эти данные вошли в совместный анализ результатов лечения 123 больных, получавших различные VEGF/VEGFR-ингибиторы – сунитиниб ($n=63$), сорафениб ($n=28$), акситиниб ($n=15$) или бевацизумаб ($n=17$), выполненный в рамках нескольких клинических исследований [17]. Различные варианты *VHL*-мутаций и гиперметилирование промотора гена выявлены у 60 (49%) и 12 (10%) больных соответственно. В целом данные генетические изменения не оказывали существенного влияния на вероятность достижения регрессий, но в подгруппе пациентов с функционально значимыми нарушениями в *VHL*-гене (нонсенс-мутации, делеции, инсерции) частота получения объективных эффектов была достоверно выше, чем у остальных больных (51% против 31%). Многофакторный анализ также подтвердил значимость функциональных нарушений в *VHL*-гене с точки зрения прогнозирования достижения полных и частичных регрессий. Также в данной подгруппе пациентов имела место тенденция к удлинению времени до прогрессирования заболевания (13,7 мес против 9 мес).

В то же время в другом исследовании терапия pazopanibом (ингибитор VEGFR-1–3, PDGFR, c-KIT) была одинаково эффективной у больных как с нормальным, так и с мутированным *VHL*-геном [18]. Однако в связи с тем, что данная работа представлена только в тезисном виде, она не содержит информации о типе мутаций и о возможном их влиянии на функциональную активность *VHL*-гена.

Таким образом, появился ряд вопросов, требующих научного объяснения. Например, каковы причины клинической неэффективности антиангиогенных препаратов при наличии *VHL*-мутации? И наоборот, почему регистрируются ремиссии при отсутствии мутации данного гена в опухолевых клетках? При реше-

нии этих проблем в первую очередь необходимо помнить о том, что *VHL*-мутация или другие нарушения в *VHL*/HIF-зависимом сигнальном пути при метастатическом сПКР не обязательно являются единственными возможными механизмами развития опухоли или факторами, регулирующими процессы неоангиогенеза в опухолевой ткани. В этих случаях использование препаратов, действие которых направлено на элементы данного сигнального пути (ингибиторы mTOR — mammalian target of rapamycin — мишень рапамицина в клетках млекопитающих; VEGFR; PDGFR; VEGF), оказывается неэффективным. С другой стороны, гиперпродукция HIF и соответствующих факторов роста может наблюдаться при нормально функционирующем *VHL*-гене, поскольку уровень транскрипционного фактора HIF-1—2α внутри клетки при сПКР может регулироваться не только на посттрансляционной стадии с помощью *pVHL*, но и за счет активации сигнального пути PI3K—АКТ—mTOR, непосредственно стимулирующего биосинтез HIFα в избыточном количестве. По этой причине назначение ингибиторов VEGF/VEGFR может иметь успех даже при отсутствии *VHL*-мутации.

Данная гипотеза подтверждается результатами клинического исследования, в котором у больных ПКР *in vivo* изучали связь между мутациями *VHL*-гена, гиперэкспрессией HIF и VEGF, измеряемых иммуногистохимическим (ИГХ) методом и методом Western blot [8]. Несмотря на то что между этими показателями существовала прямая корреляционная зависимость, у 2 (14%) из 14 больных без *VHL*-мутации наблюдалась гиперэкспрессия HIF-1 в опухолевых клетках, что свидетельствует о существовании альтернативных механизмов регулирования концентрации HIF.

Таким образом, внутриклеточный уровень HIF как ключевого элемента сигнального пути, отвечающего за неоангиогенез, может также являться дополнительным или самостоятельным прогностическим маркером. Например, при раке шейки матки и молочной железы повышение внутриклеточного уровня HIF являлось фактором неблагоприятного прогноза. Вероятно, данный фактор при отсутствии мутации в *VHL*-гене позволяет опухолевым клеткам приобрести в процессе деления более агрессивный фенотип и резистентность к лекарственной терапии, поскольку они легче адаптируются к условиям гипоксии [19, 20]. Исследований, посвященных изучению прогностической роли HIF при ПКР, немного. В настоящее время известно, что данный фактор экспрессируется в минимальном количестве здоровой ткани почки и практически не экспрессируется при неслетлоклеточных вариантах ПКР. В одном из исследований, проведенном в группе больных метастатическим сПКР ($n=141$), получавших лечение до 2000 г., уста-

новлено, что гиперэкспрессия HIF в опухолевых клетках, определяемая ИГХ-методом, ассоциирована с плохим прогнозом. Общая выживаемость 89 (63%) больных с низкой экспрессией HIF-1α в опухоли достигала 24 мес, в то время как у 52 (37%) пациентов с гиперэкспрессией — всего 13 мес [21]. При этом для 167 больных с локализованными формами сПКР данный параметр не имел существенного прогностического значения. Авторами не приводится информация о методах и эффективности лекарственных подходов, а также о связи этих показателей с молекулярными нарушениями в *VHL*-гене.

Как ни странно, эти данные противоречат результатам другого небольшого ретроспективного исследования, в которое вошли 66 больных сПКР с различными стадиями заболевания. В данном исследовании у 44 (66%) пациентов с гиперэкспрессией HIF-1 относительный риск смерти был, наоборот, достоверно ниже на 60% [22]. Также не отмечено корреляции между стадией болезни, степенью дифференцировки опухоли и уровнем HIF-1α, который измерялся методом Western blot. Стадия болезни и уровень HIF после проведения многофакторного анализа оставались единственными независимыми факторами прогноза, но наличие небольшого общего числа больных, особенно пациентов с IV стадией заболевания ($n=27$), указывает на необходимость подтверждения данных результатов в проспективных исследованиях.

Расхождение результатов 2 представленных выше анализов в оценке прогностической значимости опухолевой экспрессии HIF можно объяснить прежде всего различными методологическими подходами. При ИГХ-методе уровень HIF оценивается непосредственно в ядре опухолевой клетки, т. е. его активной формы, стимулирующей транскрипцию генов-мишеней. При методе Western blot уровень HIF определяется в белковом продукте, получаемом из лизата опухолевой ткани. В связи с тем что данный лизат может содержать как неактивную форму HIF, находящуюся в цитоплазме опухолевых клеток, так и фибробласты или другие элементы воспаления, также богатые HIF, интерпретация результатов данного метода представляет определенные сложности. Тем не менее с помощью этого же метода на небольшой группе больных ($n=43$) было продемонстрировано, что частота регрессий на фоне терапии сунитинибом при гиперэкспрессии HIF-1α достигала 92%, в то время как при ее отсутствии — всего 15% [23]. Время до прогрессирования также было достоверно выше в этой подгруппе. Таким образом, уровень экспрессии HIF в зависимости от метода его определения может иметь не только прогностическую значимость, но и являться фактором, предсказывающим эффективность антиангиогенного подхода. Более того, гиперэкспрессия HIF может одновременно ассоции-

ироваться с неблагоприятным естественным течением заболевания и в то же время являться фактором, предсказывающим эффективность некоторых ингибиторов ангиогенеза.

Процессы регуляции уровня факторов роста, ответственных за ангиогенез, многообразны и не сводятся к функционированию единственного сигнального пути (*VHL*–*HIF*–*VEGF*–*PDGF*), которому уделяется в настоящее время больше всего внимания. Например, уровень экспрессии опухолью *VEGF* может также регулироваться с помощью других сигнальных систем, в том числе зависеть от состояния гена *p53* или изменения внутриклеточного уровня оксида нитрата. В упомянутой ранее работе, в которой оценивали взаимосвязь между мутацией в гене *VHL*, экспрессией *HIF* и уровнем *VEGF*, у 5 (33%) из 15 пациентов с опухолью, гиперпродуцирующей *VEGF*, наличия гиперэкспрессии *HIF* не зарегистрировано. Таким образом, подтверждается существование альтернативных *VHL*–/*HIF*–независимых механизмов регулирования концентрации *VEGF* и неоангиогенеза в целом. На это косвенно указывает эффективность применения анти-*VEGF*/*VEGFR*-терапии при других видах опухолей – рак печени, молочной железы, толстой кишки, которые в меньшей степени ассоциированы с дисфункцией *HIF* и/или мутацией, происходящей в *VHL*-гене [24–26].

VEGF и VEGFR

Поскольку внутриклеточный синтез *VEGF* является одним из завершающих этапов реализации проангиогенного сигнала, исходный уровень данного фактора роста в плазме крови также может коррелировать с прогнозом больных сПКР. В некоторых исследованиях было доказано, что повышенный исходный уровень *VEGF* в плазме крови является негативным прогностическим фактором, ассоциированным с низкой общей выживаемостью больных метастатическим ПКР [27]. В рандомизированном исследовании TARGET (сорафениб против плацебо) среди больных, получавших плацебо, время до прогрессирования было достоверно выше в группе с низким исходным уровнем *VEGF* [28]. Однако ни в данном исследовании, ни в исследовании AVOREN (ИФН + бевацизумаб против ИФН) уровень *VEGF* в плазме до начала лечения не являлся фактором, предсказывающим эффективность антиангиогенной терапии [29]. Добавление бевацизумаба к ИФН α достоверно увеличивало время до прогрессирования с 6,8 до 13 мес у больных с уровнем *VEGF* ниже медианы и с 3,8 до 7,6 мес у пациентов со значением *VEGF* выше медианы. Таким образом, применение сорафениба или комбинации ИФН + бевацизумаб улучшало показатели выживаемости у больных как с высоким, так и с низким исходным уровнем *VEGF*.

В отдельных исследованиях изучали прогностическое значение различных фракций *VEGF* (*VEGF*-*A*–*C*) и растворимой формы *VEGFR* (*sVEGFR*-1–3), а также их динамику в процессе проведения антиангиогенной терапии. Известно, что семейство *VEGF* представлено несколькими видами факторов роста (*A*–*F*) в зависимости от той роли, которую они играют в развитии сосудистой сети и специфичности к тому или иному виду рецепторов (*VEGFR*-1–3). *VEGF*-*A* посредством воздействия на располагающиеся на мембране эндотелиальных клеток рецепторы (*VEGFR*-1 и *VEGFR*-2) стимулирует сосудобразование как за счет повышения проницаемости уже существующих капилляров с последующим выходом протеаз, протеинов и факторов роста в периваскулярное пространство, так и за счет усиления пролиферации и миграции эндотелиальных клеток и их предшественников. В свою очередь, *VEGF*-*C* и *D* активируют лимфангиогенез за счет связывания с *VEGFR*-2–3 на поверхности лимфоэндотелиальных клеток. Биологическое значение растворимых форм тирозинкиназных рецепторов не совсем понятно с точки зрения их роли в регуляции сигнальных путей в физиологических условиях или при развитии заболевания, а также степени их биодоступности для связывания с лигандами. На фоне приема сунитиниба (тирозинкиназный ингибитор *VEGFR*-2–3) у 63 пациентов метастатическим сПКР наблюдалось снижение уровня *sVEGFR*-2, *sVEGFR*-3 и повышение содержания *VEGF*-*A* [30]. При этом у 25 больных с объективным эффектом (критерии RECIST) динамика данных показателей к 28-му дню терапии была более выраженной, чем у пациентов со стабилизацией или прогрессированием болезни, хотя исходные значения данных показателей в обеих группах достоверно не различались. Аналогичные результаты получены при использовании пазопаниба, когда существенное снижение концентрации *sVEGFR*-2 в плазме к 14-му дню терапии косвенно указывало на более высокую вероятность достижения объективного эффекта и увеличение времени до прогрессирования [18]. Данные наблюдения согласуются с результатами клинических исследований, в которых сунитиниб использовали у больных раком молочной железы или при нейроэндокринных опухолях, где также была отмечена зависимость между клиническим эффектом и динамикой *VEGF*, *sVEGFR*-2–3 [31, 32]. Таким образом, динамика данных биомаркеров может являться показателем фармакодинамической активности тирозинкиназных ингибиторов *VEGFR* и позволяет на ранних этапах лечения выделить ту группу больных, в которой достигнута оптимальная, с точки зрения противоопухолевого воздействия, концентрация препаратов. С другой стороны, данные молекулярные показатели могут служить факторами, предсказывающими

эффективность ингибиторов VEGFR. Так, в одном из клинических исследований сунитиниб применяли для лечения 61 больного метастатическим ПКР после развития у них резистентности к комбинации ИФН + бевацизумаб [33]. У 14 (23%) больных была зарегистрирована частичная регрессия, а сокращение в той или иной степени размеров опухолевых образований наблюдалось в 84% случаев. Медиана времени до прогрессирования составила 30 нед. В группе пациентов с исходно низким по отношению к медиане уровнем sVEGFR-3 или VEGF-C в плазме крови частота достижения объективных эффектов была достоверно выше, а время до прогрессирования увеличивалось с 19 до 36 и с 22 до 46 нед соответственно. При этом противоопухолевая активность сунитиниба не зависела от предшествующей эффективности использования комбинации ИФН + бевацизумаб. С одной стороны, данное наблюдение указывает на отсутствие перекрестной резистентности между препаратами, а с другой — подчеркивает роль именно sVEGFR/VEGF-C в регулировании активности сигнальных путей, ассоциированных с развитием метастатического ПКР.

Общим недостатком представленных выше исследований является отсутствие четкого определения клинического и биологического эффектов при использовании антиангиогенных или таргетных препаратов, так как с помощью критериев RECIST уже не представляется возможным объективно отразить степень их противоопухолевой активности. Соответственно, попытки обнаружить корреляции между молекулярными факторами и непосредственными эффектами, в основе которых лежат RECIST-критерии, также могут быть скомпрометированы. Тем не менее анализ прогностической роли тех факторов, которые являются непосредственными мишенями для антиангиогенных противоопухолевых препаратов, представляется очень привлекательным направлением в клинических исследованиях.

Уровень экспрессии СА IX

Другим биомаркером, напрямую ассоциированным с функционированием *VHL*/HIF-зависимого сигнального пути и, возможно, также имеющим потенциальное прогностическое значение, является трансмембранный протеин СА IX. В физиологических условиях данный фермент отвечает за поддержание кислотно-щелочного баланса (рН) во внеклеточном матриксе посредством связывания ионов H^+ с гидрокарбонатом натрия. В нормальной ткани при ИГХ-исследовании экспрессия СА IX обнаруживается только в эпителии слизистой желудка, тонкой кишки, яичников, желчного пузыря и в мезотелии. СА IX экспрессируется также опухолевыми клетками при немелкоклеточном раке легкого, раке шейки матки, толстой кишки и яичников и одновременно

является негативным фактором прогноза [34]. Предполагается, что с помощью СА IX опухолевые клетки могут временно адаптироваться к ацидозному «стрессу» при гипоксическом состоянии, который возникает в процессе активного неконтролируемого деления. Как следствие, опухоль приобретает еще более агрессивный фенотип [35–38]. При ПКР экспрессию СА IX выявляют в основном при светлоклеточном подтипе с частотой 87–97%. При других гистологических вариантах — папиллярном или хромофобном — частота экспрессии данного протеина опухолевыми клетками не превышает 20 и 4% соответственно [39]. Парадоксально, но в отличие от других заболеваний, при сПКР гиперэкспрессия СА IX может наоборот являться благоприятным прогностическим фактором. В группе, включавшей 321 больного, наличие экспрессии СА IX различной степени выраженности в первичной опухоли или метастазах было установлено в 94% случаев [40]. Критерием гиперэкспрессии СА IX являлось ИГХ-окрашивание > 85% опухолевых клеток, при котором было зафиксировано наиболее аккуратное влияние данного фактора на прогноз пациентов. Среди 149 больных с отдаленными метастазами, большинство из которых получали внутривенно интерлейкин-2 (ИЛ-2), медиана выживаемости в подгруппе с опухолевой гиперэкспрессией СА IX достигала 24,8 мес по сравнению с 5,5 мес при ее отсутствии. После проведения многофакторного анализа данный параметр сохранил свое независимое прогностическое значение у пациентов с отдаленными метастазами. В то же время при наличии локализованного процесса уровень экспрессии СА IX не оказывал существенного влияния на выживаемость больных. В последующей работе, в которой анализировали результаты терапии ИЛ-2, у 66 пациентов с метастатическим сПКР, было продемонстрировано, что эффективность данного вида иммунотерапии при СА IX-гиперэкспрессии достигает 51%, в то время как при ее отсутствии — 24%. Общая выживаемость была также достоверно выше у больных с гиперэкспрессией СА IX [41]. В другом исследовании при оценке прогностического значения СА IX у 730 больных сПКР были получены противоречивые сведения [40]. По результатам многофакторного анализа, уровень экспрессии СА IX не являлся независимым фактором прогноза как для всей группы больных, так и в подгруппе, состоящей из 81 (11%) пациента с отдаленными метастазами, в которой только 6% больных получили внутривенно ИЛ-2. С учетом результатов, полученных в предыдущих исследованиях, авторы предполагают, что уровень экспрессии СА IX в большей степени является фактором, предсказывающим эффективность терапии ИЛ-2, чем фактором прогноза, который отражал бы особенности биологического течения болезни. Возможно, что СА IX является опухолеассоциированным антигеном, распозна-

ваемым ИЛ-2-активированными Т-лимфоцитами. Гиперэкспрессия СА IX также может способствовать поддержанию значения рН во внеклеточной среде, которое было бы оптимальным для реализации противоопухолевого иммунного ответа. В то же время при изучении прогностической значимости данного маркера у 20 больных, получавших ингибитор mTOR темсиролимус, не выявлено корреляции между частотой достижения объективных эффектов и уровнем экспрессии СА IX [42]. В настоящее время проводится проспективное клиническое исследование, в котором повышенный уровень экспрессии СА IX является критерием отбора больных для назначения высоких доз ИЛ-2.

Заключение

Несмотря на бурное развитие терапевтических подходов при ПКР, наблюдавшееся в течение нескольких последних лет, и улучшение результатов лечения больных, остается невыясненным, какие пациенты нуждаются в том или ином виде лечения. В отличие от таких заболеваний, как аденокарцинома легкого или рак толстой кишки, при которых мутации в генах *EGFR* и *K-RAS* служат факторами, предсказывающими чувствительность к ингибиторам *EGFR*, наличие мутации в *VHL*-гене или других молекулярных маркеров в настоящее время по целому ряду причин не может являться абсолютным ориентиром для назначения ингибиторов *VEGF/VEGFR* или других таргетных препаратов, воздействующих на различные элементы данного сигнального пути. Во-первых, пока нет четкого представления о том, какие именно мутации в *VHL*-гене приводят к полному прекращению синтеза его белкового продукта — *pVHL*, т. е. являются инактивирующими. Так, при миссенс-мутациях может сохраняться синтез *pVHL*, а метилирование промотора также не всегда сопровождается полной утратой функции гена, которая отчасти зависит от степени метилирования, поэтому четко провести границу между функционально значимыми и незначимыми нарушениями в гене очень сложно [12, 43, 44]. В связи с этим неколичественные методы оценки функционального статуса данного гена при сПКР являются не вполне адекватными и, вероятно,

определение уровня белкового продукта гена *VHL* в опухолевых клетках (*pVHL*) поможет более точно отразить степень его функциональной активности.

Во-вторых, группы больных в представленных анализах немногочисленны и разнородны по своим клиническим характеристикам и методам лекарственного лечения, для того чтобы делать однозначные выводы. Известно, что между мультитаргетными препаратами, обладающими даже схожим механизмом действия, нет полной перекрестной резистентности в силу возможного существования дополнительных мишеней или большей ингибирующей способности различных лекарственных средств в отношении общих мишеней. Более того, характер молекулярных нарушений при ПКР не ограничивается одной или несколькими генетическими поломками, например, как при гастроинтестинальных стромальных опухолях, а подразумевает наличие альтернативных сигнальных путей, регулирующих пролиферативную активность и процессы ангиогенеза. Так, в доклинических и клинических исследованиях, в которых изучали возможные причины развития первичной и вторичной резистентности к ингибиторам *VEGF/VEGFR*, продемонстрировано повышение активности других проангиогенных факторов (*FGF*, ИЛ-8) на фоне лечения, что помогает опухолевым клеткам «ускользнуть» от антиангиогенного воздействия данных препаратов. По этой причине молекулярные маркеры могут иметь различное прогностическое значение для каждого из таргетных препаратов, обладающих антиангиогенной активностью. Другое, на наш взгляд, интересное направление клинических исследований — поиск молекулярных факторов и иммунологических параметров, предсказывающих чувствительность к иммунотерапии. Это обусловлено наличием группы больных (5–7%) с исходно благоприятным прогнозом (по критериям *MSKCC*), у которых с помощью применения данного метода лечения можно добиться полной регрессии заболевания, сопоставимой по длительности с полным излечением. Авторы надеются, что последующие исследования прольют больше света на эти проблемы и позволят найти более надежный инструмент для определения показаний к использованию того или иного вида лекарственной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lonser R.R., Glenn G.M., Walther M. et al. Von Hippel–Lindau disease. *Lancet* 2003;361:2059–67.
2. Latif F., Tory K., Gnarr J. et al. Identification of the von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317–20.
3. Iliopoulos O., Levy A.P., Jiang C. et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel–Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10595–9.
4. Foster K., Prowse A., van den Berg A. et al. Somatic mutations of the von Hippel–Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 1994;3:2169–73.
5. Gnarr J.R., Tory K., Weng Y. et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994;7:85–90.
6. Shuin T., Kondo K., Torigoe S. et al. Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel–Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:2852–5.
7. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al.

- Improved identification of von Hippel–Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:4726–34.
8. Nuan X., Rian C., Messing E. et al. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to VHL tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 α expression in renal cell carcinoma. *J Urol* 2003;170:588–92.
9. Brauch H., Weirich G., Brieger J. et al. VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 2000;60:1942–8.
10. Schraml P., Struckmann K., Hatz F. et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002;196:186–93.
11. Gimenez-Bachs J.M., Salinas-Sanchez A.S., Sanchez-Sanchez F. et al. Determination of VHL gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006;49:1051–7.
12. Kondo K., Yao M., Yoshida M. et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Gen Chromosom Cancer* 2002;34:58–68.
13. Yao M., Yoshida M., Kishida T. et al. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1569–75.
14. Patard J.J., Fergelot P., Karakiewicz P.I. et al. Low CA IX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008;123:395–400.
15. Smits K.M., Schouten L.J., van Dijk B.A. et al. Genetic and epigenetic alterations in the von hippel-lindau gene: the influence on renal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2008;14:782–7.
16. Rini B.I., Jaeger E., Weinberg V. et al. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and von Hippel–Lindau gene status. *BJU Int* 2006;98:756–62.
17. Choueiri T.K., Vaziri S.A., Jaeger E. et al. Von Hippel–Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2008;180:860–5;discussion 865–6.
18. Hutson T., Davis I.D., Macheils J.H. et al. Biomarker analysis and final efficacy and safety results of a phase II renal cell carcinoma trial with pazopanib (GW786034), a multi-kinase angiogenesis inhibitor. *J Clin Oncol* 2008;26: abstr 5046.
19. Birner P., Schindl M., Obermair A. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavourable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693–6.
20. Schindl M., Schoppmann S.F., Samonigg H. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavourable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1831–7.
21. Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al. Hypoxia-inducible factor 1 α in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7388–93.
22. Lidgren A., Hedberg Y., Grankvist K. et al. The expression of hypoxia-inducible factor 1 α is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1129–35.
23. Patel P.H., Chada Lavada R.S., Ishill N.M. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α and 2 α levels in cell lines and human tumor predicts response to sunitinib in renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol* 2008;26: (20 Suppl):abstr 5008.
24. Miller K., Wang M., Gralow J. et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666–76.
25. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335–42.
26. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90.
27. Jacobsen J., Rasmussen T., Grankvist K. et al. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 2000;163:343–7.
28. Escudier B., Eisen T., Stadler W. et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* 2009;27:3312–8.
29. Escudier B., Ravaud A., Negrier S. et al. Update on AVOREN trial in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): efficacy and safety in subgroups of patients (pts) and pharmacokinetic (PK) analysis. *J Clin Oncol* 2008;26: abstr 5025.
30. De Primo S.E., Bello C.L., Smeraglia J. et al. Circulating protein biomarkers of pharmacodynamic activity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: modulation of VEGF and VEGF related proteins. *J Transl Med* 2007;5:32.
31. DePrimo S.E., Friece C., Huang X. et al. Effect of treatment with sunitinib malate, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, on circulating plasma levels of VEGF, soluble VEGF receptors 2 and 3 and soluble KIT in patients with metastatic breast cancer. Presented at the American Society of Clinical Oncology 42nd Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, 2–6 June 2006.
32. Bello C.L., DePrimo S.E., Friece C. et al. Analysis of circulating biomarkers of sunitinib malate in patients with unresectable neuroendocrine tumors (NET): VEGF, IL-8, and soluble VEGF receptors 2 and 3. Presented at the American Society of Clinical Oncology 42nd Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, 2–6 June 2006.
33. Rini B.I., Michaelson D., Rosenberg J.E. et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:3743–8.
34. Ivanov S., Liao S.Y., Ivanova A. et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905–919.
35. Dorai T., Sawczuk I., Pastorek J. et al. Role of carbonic anhydrases in the progression of renal cell carcinoma subtypes: proposal of a unified hypothesis. *Cancer Invest* 2006;24:754–79.
36. Swinson D.E., Jones J.L., Richardson D. et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:473–82.
37. Maseide K., Kandel R.A., Bell R.S. et al. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:4464–71.
38. Span P.N., Bussink J., Manders P. et al. Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome. *Br J Cancer* 2003;89:271–6.
39. Leibovich B., Sheinin Y., Lohse C. et al. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25:4757–64.
40. Bui M.H., Seligson D., Han K.R. et al. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9(2):802–11.
41. Atkins M., Regan M., McDermott D. et al. Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3714–21.
42. Cho D., Signoretti S., Dabora S. et al. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2007;5(6):379–85.
43. Kawakami T., Okamoto K., Ogawa O., Okada Y. Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. *Urology* 2003;61:226.
44. Li L., Zhang L., Zhang X. et al. Hypoxia-inducible factor linked to differential kidney cancer risk seen with type 2A and type 2B VHL mutations. *Mol Cell Biol* 2007;27:5381–92.
45. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005;69(Suppl 3):4–10.