

8. Van Poppel H., Da Pozzo L., Albrecht W. et al. Prospective randomized EORTC intergroup phase 3 study comparing the complications of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006. [Epub ahead of print].
9. Uzzo R.G., Novick A.C. Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. *J Urol* 2001;166(1):6–18.
10. Thompson R.H., Leibovich B.C., Lohse C.M. Complications of contemporary open nephron sparing surgery: a single institution experience. *J Urol* 2005;174(3):855–8.
11. Jeschke K., Peschel R., Wakonig L. et al. Laparoscopic nephron-sparing surgery for renal tumors. *Urology* 2001;58:688–92.
12. Rasweiler J., Abbou C., Janetschek G. et al. Laparoscopic partial nephrectomy, the European experience. *Urol Clin North Am* 2000;27:721–36.
13. Winfield H.N., Donovan J.F., Lund G.O. et al. Laparoscopic partial nephrectomy: initial experience and comparison to the open surgical approach. *J Urol* 1995;153:1409–14.
14. Desai M.M., Gill I.S., Kaouk J.H. et al. Laparoscopic partial nephrectomy with suture repair of the pelviciceal system. *Urology* 2003;61:99–104.
15. Deutz F.J., Rubben H., Vorverk D., Lutze W. Superselective embolization of inoperable renal carcinoma in patients with solitary kidney. *Eur Urol* 1988;15(1–2):134–8.
16. Cos L.R., Gutierrez O. Repeat selective embolization of solitary with renal cell carcinoma: case report. *J Urol* 1989;141(1):115–6.
17. Sokiranski R., Gorich J., van Ahlen H. et al. Superselective embolization of tumor nodes in solitary kidney in inoperable patients. *RöFo* 1996;164(5):427–31.
18. Gebauer B., Werk M., Lopez-Hanninen E. et al. Radiofrequency ablation in combination with embolization in metachronous recurrent renal cancer in solitary kidney after contralateral tumor nephrectomy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007;30(4):644–9.
19. Поликарпов А.А., Таразов П.Г., Суворова Ю.В. и др. Ангиографическая оценка коллатерального кровообращения иноперабельной опухоли почки после эмболизации. *Урол нефрол* 1996;(3):15–7.
20. Soo C.S., Chuang V.P., Wallace S. et al. Segmental renal artery embolization in solitary renal carcinoma. *Urology* 1981;18(4):420–3.

Прогностическое значение инактивирующих нарушений в гене *VHL* у больных метастатическим почечно-клеточным раком

Д.А. Носов¹, Е.С. Яковлева¹, М.Ю. Федянин¹, Д.А. Чекини¹, М.Н. Сеницына¹, Н.А. Савёлов²,
Д.С. Михайленко³, Д.В. Залетаев³, Л.Н. Любченко¹, С.А. Тюляндин¹

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; МГОБ № 62; ²Медико-генетический центр РАМН, Москва

Контакты: Дмитрий Александрович Носов nosov@mail.ru

Цель исследования — определение частоты мутаций и гиперметилирования промотора гена *VHL* в популяции больных спорадическими формами метастатического почечно-клеточного рака (мПКР) и оценка значения данного молекулярного нарушения в качестве фактора, прогнозирующего течение заболевания и эффективность лекарственного лечения.

Материалы и методы. Опухолевый материал для генетического исследования был доступен у 88 больных мПКР, которым после диагностирования метастатического процесса в период с 1994 по 2010 гг. проводилась противоопухолевая терапия. Из них 53 пациента получали различные режимы иммунотерапии с включением интерферона (ИФН) альфа и 35 больных — таргетную терапию с включением ингибиторов *VEGFR*. Мутации *VHL* выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) экзонов 1–3, *SSCP*-анализа (*singl strand conformation polymorphism analysis* — анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма) ПЦР-продуктов и последующего секвенирования. Метилирование гена *VHL* определяли с помощью метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР).

Результаты. Соматические мутации и/или гиперметилирование промотора гена *VHL* выявлены у 23 (26%) больных, при этом у 15 пациентов наблюдалась только мутация гена *VHL* и у 7 больных только гиперметилирование промотора. В 1 случае отмечалась одновременно мутация гена и метилирование промотора. Мутации гена *VHL* выявлялись только у больных со светлоклеточным вариантом ПКР, в то время как aberrантное метилирование промотора наблюдалось как при светлоклеточном, так и при папиллярном варианте ПКР. При медиане времени наблюдения за больными 34 мес (2–127 мес) медиана времени до прогрессирования и медиана продолжительности жизни для всей группы больных составили 5,8 и 26,7 мес соответственно. У больных с наличием и отсутствием нарушений в гене *VHL* медиана времени до прогрессирования составила 5,5 и 6,9 мес ($p = 0,15$) соответственно, а медиана продолжительности жизни — 22,0 и 34,5 мес ($p = 0,98$) соответственно. При оценке влияния инактивирующих событий в гене *VHL* на результаты иммунотерапии ($n = 53$) и таргетной терапии ($n = 35$) нами не было выявлено достоверных различий в частоте объективных эффектов, времени до прогрессирования и общей выживаемости (ОВ) между подгруппами пациентов с нормальным (*VHL* «—») и поврежденным (*VHL* «+») геном *VHL* ($p > 0,05$).

Выводы. У больных мПКР мутации и/или гиперметилирование промотора гена *VHL* наблюдались в 26% случаев. Данные инактивирующие нарушения в гене *VHL* не имели самостоятельного прогностического значения и не оказывали достоверного влияния

на частоту объективных эффектов, время до прогрессирования и ОВ больных мПКР при проведении иммунотерапии с включением ИНФ или антиангиогенной терапии ингибиторами VEGFR.

Ключевые слова: метастатический рак почки, таргетная терапия, мутации гена VHL, гиперметилирование промотора

Prognostic value of VHL gene alteration in patients with metastatic renal cell carcinoma

D.A. Nosov¹, E.S. Yakovleva¹, M.Yu. Fedyanin¹, D.A. Chekini¹, M.N. Sinitsyna¹, N.A. Savelov², D.S. Mikhailenko³, D.V. Zaletayev³, L.N. Lyubchenko¹, S.A. Tjulandin¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences (Moscow); ²Moscow Cancer Hospital №62; ³Research Center for Medical Genetics (Moscow)

Objective: to estimate the rate, predictive and prognostic value of VHL gene alterations in the population of patients with sporadic metastatic renal cell carcinoma (mRCC).

Subjects and methods. Paraffin embedded tumor tissue blocks were available from 88 patients with mRCC who had undergone antitumor therapy in 1994–2010. Of them, 53 patients received only immunotherapy regimens with interferon (IFN)- α and 35 patients had targeted therapy with VEGFR inhibitors. VHL mutations were detected by polymerase chain reaction (PCR) for exons of 1–3, single-strand conformation polymorphism analysis of PCR products, and further sequencing. VHL gene methylation was determined by methyl-sensitive PCR.

Results. Somatic mutations and/or promoter hypermethylation of the VHL gene were found in 23 (26%) patients; Of them, VHL gene mutations and promoter hypermethylation were found in 15 patients and 7 patients respectively. Mutation and promoter methylation VHL were simultaneously observed in one case. VHL gene mutations were detected only in patients with clear cell RCC while aberrant promoter methylation was seen in both clear cell and papillary RCC. With a median follow-up of 34 months (range, 2–127 months), the median time to progression (TTP) and median overall survival (OS) for the entire group of patients were 5.8 and 26.7 months, respectively. In patients with and without VHL gene alterations, the median TTP was 5.5 and 6.9 months, respectively ($p = 0.15$) and the median overall survival time was 22.0 and 34.5 months, respectively ($p = 0.98$). Moreover, the subgroup analysis revealed that VHL gene inactivation events had no impact on the objective response rate (ORR), TTP and OS in the subgroup of patients who received immunotherapy ($n = 53$) or antiangiogenic targeted therapy ($n = 35$) ($p > 0.05$).

Conclusion. VHL gene mutations and/or promoter hypermethylation observed in 26% of patients with mRCC. These VHL gene alterations were neither prognostic nor predictive factors in mRCC patients during immunotherapy with IFN or antiangiogenic therapy with VEGFR inhibitors.

Key words: metastatic renal cell carcinoma, targeted therapy, VHL gene mutation, promoter hypermethylation

Введение

До недавнего времени неспецифическая иммунотерапия с использованием интерферонов альфа (ИФН- α) и интерлейкина-2 (ИЛ-2) как в монорежимах, так и в комбинациях являлась единственным стандартом лекарственного лечения больных метастатическим ПКР (мПКР) при относительно невысокой средней частоте объективных эффектов — всего 15% [2]. Существенное улучшение результатов лечения пациентов с мПКР связано с активным использованием в клинической практике таргетных препаратов (сунитиниб, сорафениб, бевацизумаб, пазопаниб, темсиролимус, эверолимус), действие которых основано на понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе развития данного заболевания.

Известно, что в 1–2% случаев почечно-клеточный рак (ПКР) является одним из проявлений наследственного синдрома Хиппеля—Линдау (VHL) — аутосомно-доминантного заболевания, обусловленного инактивацией одноименного супрессорного гена вследствие его герминальной мутации [3–5]. С учетом результатов молекулярно-генетических исследований, проведенных у больных с синдромом VHL, была высказана гипотеза о том, что нарушение активности

гена VHL и контролируемых им внутриклеточных сигнальных путей служит одним из основных этапов опухолевой трансформации при развитии спорадических форм светлоклеточного рака почки (сПКР). Соматические мутации и/или гиперметилирование промотора данного гена при сПКР, по данным разных авторов, выявляются в 30–70 и 5–10% случаев соответственно. При других гистологических вариантах ПКР — папиллярном, хромофобном и тубулярном раке, мутации гена VHL не выявляются [1, 6–8]. Как правило, одновременно с мутацией гена VHL обнаруживается потеря гетерозиготности (LOH) в результате аллельной делеции локуса 3p25 [9]. Данные события сопровождаются инактивацией гена VHL, в результате которой он уже не способен выполнять свою функцию.

Ген VHL локализован на коротком плече 3-й хромосомы (3p25) и содержит 3 экзона. В физиологических условиях белковый продукт (pVHL) данного гена, который по природе своей является геном-супрессором, обеспечивает внутриклеточную регуляцию уровня транскрипционного фактора HIF-1 α и HIF-2 α (фактор, индуцируемый гипоксией), связываясь с HIF и инактивируя его в результате протеасомной деградации. Для связывания pVHL с HIF-1 α последний дол-

жен быть подвергнут гидроксигированию с помощью фермента HIF пролилгидроксилазы (HPHs), который служит своеобразным сенсором для определения внутриклеточной концентрации кислорода. При гипоксии активность данного фермента падает, соответственно HIF не может быть гидроксигирован, а pVHL, в свою очередь, не способен его эффективно связать и инактивировать. В результате наблюдается внутриклеточная аккумуляция HIF- α , его перемещение в ядро с образованием активного транскрипционного комплекса HIF- α с другой субъединицей HIF- β . Данный комплекс стимулирует транскрипцию других генов, ответственных за синтез сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF-A-C), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), трансформирующего фактора роста (TGF- α), инсулиноподобного фактора роста (IGF), карбоангидразы-IX (CA-IX) и ряда других факторов, которые позволяют клетке временно адаптироваться к гипоксии. При опухолевой трансформации, сопровождающейся инактивацией гена *VHL*, внутриклеточный уровень HIF повышается, а продуцируемые опухолевыми клетками в большом количестве факторы роста (VEGF и PDGF) служат мощными стимуляторами опухолевого неоангиогенеза. В результате физиологический механизм временной адаптации клетки к условиям гипоксии начинает «работать» на опухоль. В одном из исследований была продемонстрирована четкая корреляция между мутацией в гене *VHL*, гиперэкспрессией HIF-1 α и гиперпродукцией VEGF в опухолевой ткани у больных сПКР [10].

Таким образом, молекулярные нарушения на различных этапах *VHL*-зависимого сигнального пути, в частности инактивация гена *VHL*, с одной стороны, могут обосновывать использование ингибиторов ангиогенеза в лечении данного заболевания, а с другой — могут иметь прогностическую значимость и предсказывать эффективность лекарственных подходов при ПКР. Связь мутации *VHL* с важнейшими клиническими характеристиками изучалась в нескольких ретроспективных исследованиях, в ходе которых было продемонстрировано, что инактивирующие нарушения в гене *VHL* происходят уже на ранних стадиях заболевания и предположительно являются одним из ключевых событий в канцерогенезе данного вида опухоли. В некоторых исследованиях, результаты которых достаточно противоречивы, оценивали также влияние инактивирующих событий в гене *VHL* (вследствие соматических мутаций и/или гиперметилирования промотора) на прогноз больных сПКР.

В отдельных работах наличие мутации *VHL* ассоциировалось с улучшением выживаемости больных с локальными формами сПКР после радикальной нефрэктомии [11, 12]. В то же время в одном из исследований не было выявлено четкой связи между нарушением функции гена *VHL* у 185 больных сПКР и их прогнозом

независимо от стадии заболевания [13]. При этом у пациентов с IV стадией заболевания на момент диагностирования ($n = 32$) частота выявляемых мутаций *VHL* не превышала 19%. Авторами не приводятся данные о методах лекарственного лечения, их эффективности и связи с выявленными молекулярными нарушениями из-за небольшого числа пациентов с поздними стадиями болезни (N+ и M1). В другой работе инактивирующие мутации в гене *VHL*, зарегистрированные всего в 17% случаев, служили отрицательным прогностическим фактором для 83 больных сПКР I–IV стадии [14]. Пока нет единого мнения о прогностической значимости генетических и эпигенетических нарушений в гене *VHL* в связи с тем, что анализируемые группы больных слишком разнородны по своим клиническим характеристикам, стадиям и методам определения инактивирующих мутаций. Для подгруппы больных с распространенным опухолевым процессом также трудно сделать какие-либо однозначные выводы о влиянии мутации *VHL* на общую выживаемость (ОВ) и эффективность лечения, поскольку число больных с IV стадией было крайне ограничено, а анализ выживаемости больных в представленных выше исследованиях проводился еще до активного использования в клинической практике таргетных лекарственных подходов. С появлением новых патогенетически обоснованных лекарственных подходов необходимость в идентификации молекулярных маркеров, предсказывающих противоопухолевую эффективность терапии, стала ощущаться еще более остро. Различные нарушения в *VHL*/HIF/VEGF-сигнальном пути теоретически могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров.

Цель исследования — определение частоты мутаций и гиперметилирования промотора гена *VHL* в популяции больных спорадическими формами диссеминированного ПКР, а также оценка значения данного молекулярного нарушения в качестве фактора, прогнозирующего течение заболевания и эффективность лекарственного лечения.

Материалы и методы

Проанализированы данные истории болезни 267 больных диссеминированным ПКР, которые получали различные варианты иммунотерапии и антиангиогенной терапии в отделении клинической фармакологии и химиотерапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 1994 по 2010 г. У 88 пациентов опухолевый материал (парафиновые блоки) был доступен для молекулярно-генетического и иммуногистохимического (ИГХ-) исследований. У 86 пациентов генетическое исследование проводилось на опухолевом материале, полученном из первичной опухоли, и у 2 больных использовался материал после удаления отдаленных метастазов. В анализ были включены следующие данные на каждого из 88 пациентов: инфор-

мация о поле, возрасте, гистологическом варианте опухоли, стадии на момент диагностирования болезни, характере метастазирования, исходные лабораторные показатели, наличие молекулярно-генетических нарушений гена *VHL*, вид лекарственного лечения. В дополнение к этому были проанализированы результаты проведенной терапии: частота объективных эффектов, время до прогрессирования и ОВ. Непосредственная эффективность лечения оценивалась в соответствии с RECIST-критериями. ОВ рассчитывалась от дня начала лечения до даты последнего наблюдения/смерти. Время до прогрессирования определялось от даты начала лечения до даты прогрессирования. Выбывшие из-под наблюдения пациенты были цензурированы на момент проведения анализа по дате их последнего визита. Время до прогрессирования и ОВ анализировались методом Каплана—Майера, сравнение данных показателей проводилось с помощью log-rank-теста. Непараметрические данные в зависимости от количества наблюдений анализировались с использованием теста χ^2 или точного критерия Фишера. Во всех случаях применялся 95% доверительный интервал и двусторонний *p*.

Определение мутаций и/или гиперметилирования промотора гена *VHL*. Анализ соматических мутаций и aberrантного метилирования гена *VHL* проводили в лаборатории эпигенетики Медико-генетического научного центра РАМН.

Выделение ДНК из клинического материала. Предварительно получали 3–5 срезов по 25 мкм каждый с поверхности парафиновых блоков (архивный материал первичной опухоли/метастазов). Затем проводили депарафинизацию срезов ксилолом и этанолом, выделяли геномную ДНК методом обработки образцов протеиназой К с последующей фенолхлороформной экстракцией.

Обработка геномной ДНК метилчувствительной рестриктазой. Для анализа метилирования промоторных областей исследуемых генов проводилась обработка геномной ДНК метилчувствительной рестриктазой BstHNI. К 0,1–0,5 мкг геномной ДНК добавляли 15 е.а. BstHNI, 2 мкл соответствующего 10-кратного буфера и деионизованную воду до объема 20 мкл. Инкубировали смесь при 50 °С в течение 10–16 ч.

Анализ мутаций в кодирующей части гена *VHL*. Мутации *VHL* выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) экзонов 1–3, SSCP-анализа (single strand conformation polymorphism analysis — анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма) ПЦР-продуктов и последующего секвенирования. Экзон 1 из-за его большой протяженности анализировали как 3 отдельных ПЦР-продукта с частично перекрывающимися последовательностями.

Метилчувствительная ПЦР (МЧ-ПЦР). Метилирование гена *VHL* определяли с помощью МЧ-ПЦР. Мат-

рицей для МЧ-ПЦР служили 2 мкл продуктов рестрикции BstHNI. В качестве внутреннего контроля МЧ-ПЦР амплифицировали 2-й экзон *VHL*. Контролем полноты гидролиза служила ПЦР рестрикционных фрагментов MspI, проводимая в тех же условиях. Рестриктаза MspI не чувствительна к метилированию, ее сайт узнавания, как и BstHNI, содержит CpG-динуклеотид.

Секвенирование ПЦР-продуктов. ПЦР-продукты подвергали электрофорезу в агарозном геле, затем элюировали с помощью колонок Quantum Prep® Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad Laboratories) согласно протоколу фирмы-производителя. Секвенирование проводили с использованием BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI3100 в соответствии с протоколами фирмы Applied Biosystems.

ИГХ-исследование экспрессии HIF-1 α . ИГХ-исследование выполнялось в молекулярно-биологической лаборатории МГОБ № 62.

Подготовка материала. Срезы толщиной 3–4 мкм монтировались на полилизиновые стекла и высушивались при $t = 54$ °С в течение ночи в термостате. После депарафинизации в ксилоле, проводки по спиртам и регидратации в дистиллированной воде стекла со срезами помещались в РТ-модуль, где производилась демаскировка антигенов в 10мМ Tris / 1мМ EDTA с 0,3% Tween 20 (pH 9,1) в течение 20 мин. Затем препараты отмывались в 0,3% растворе Tween 20 и помещались в автостейнер (Autostainer 360 2D, Thermo Scientific, USA).

Протокол иммунного окрашивания. Нанесение 3% водного раствора H₂O₂ — 10 мин, отмывка 0,3% Tween 20, нанесение 1М Tris / 0.1 глицин (pH 7,4) — 15 мин, отмывка 0,3% Tween 20, нанесение первых антител к HIF-1 α (клон H1 α 67, 1:300, Thermo Scientific, USA), отмывка в TBST — 2 раза по 5 мин, нанесение системы детекции (UltraVision Quanto Detection System HRP, Thermo Scientific, USA, в соответствии с прилагаемой инструкцией), инкубация диаминобензидина — 10 мин, отмывка в дистиллированной воде — 2 раза по 5 мин, инкубация в 0,5% растворе медного купороса — 5 мин, докраска ядер гематоксилином, проводка по спиртам и ксилолу, заключение под покровное стекло.

Оценка результатов иммунного окрашивания. Проводилась качественная оценка иммунного окрашивания. Оценивались следующие параметры: тип клеток, экспрессирующих HIF-1 α , компартиментализация сигнала (ядерная или цитоплазматическая экспрессия). Внутренним положительным контролем служил гломерулярный эндотелий.

Результаты

Группа из 88 больных, включенных в данный анализ, представляла собой типичную выборку пациентов с мПКР (табл. 1). По данным гистологического исследования, в 95 и 3% случаев соответственно опухоль

Таблица 1. Характеристика больных мПКР, включенных в анализ

Параметр	Значение
Пол, n = 88 (100%)	
муж.	61 (69%)
жен.	27 (31%)
Средний возраст, лет	56 (19–91)
Стадия на момент постановки диагноза, n (%)	
I–II	13 (15)
III–IV	64 (72)
неизвестно	11 (13)
Гистологический вариант, n (%)	
светлоклеточный	76 (86)
светлоклеточный с саркоматоидным компонентом	8 (9)
папиллярный	3 (3)
почечно-клеточный (без уточнения)	1 (1)
Степень дифференцировки опухоли, n (%)	
G ₁₋₂	35 (40)
неизвестно	33 (38)
	20 (22)
Локализация метастазов, n (%)	
легкие	31 (35)
ЛУ	22 (25)
кости	14 (16)
печень	4 (5)
мягкие ткани	2 (2)
надпочечники	4 (5)
Число пораженных метастазами органов, n (%)	
1	38 (43)
2	39 (44)
≥3	11 (13)
Статус ECOG, n (%)	
0	24 (27)
1	47 (53)
≥2	17 (20)
Нефрэктомия, n (%)	
радикальная нефрэктомия	40 (46)
паллиативная нефрэктомия	46 (52)
резекция почки	1 (1)
не выполнялась	1 (1)
Вид терапии, n (%)	
иммунотерапия ИФН	53 (60)
антиангиогенная терапия	35 (40)
тивозаниб	31
сунитиниб	1
пазопаниб	2
сорафениб	1
Инактивирующие нарушения в гене VHL, n (%)	
мутация VHL	23 (26)
гиперметилирование промотора VHL	15 (17)
мутация + гиперметилирование VHL	7 (8)
	1 (1)

была представлена светлоклеточным и папиллярным гистологическим вариантом ПКР. У 31 (35%) больного метастазы локализовались в легких, у 22 (25%) — в лимфатических узлах (ЛУ), у 14 (16%) — в костях, у 4 (5%) — в печени. У 80% больных общий соматический статус, оцениваемый по шкале ECOG, составлял 0–1 балл. В подавляющем большинстве случаев (98%) на различных этапах заболевания больным была выполнена паллиативная или радикальная нефрэктомия до начала лекарственного лечения.

С лечебной целью на этапе диссеминации процесса в отношении 53 (60%) больных были использованы различные режимы иммунотерапии с включением ИФН в качестве 1-й линии лекарственного лечения. Всем больным иммунотерапевтической группы лечение проводилось в 1994–2005 гг., поэтому ни один из них в дальнейшем при прогрессировании болезни не получал таргетную терапию. Антиангиогенная терапия с включением ингибиторов VEGFR (тивозаниб, сунитиниб, сорафениб, пазопаниб) применялась в отношении 35 (40%) пациентов в качестве 1-й или 2-й линии лечения в 2005–2010 гг.

Мутации и/или гиперметилирование промотора гена *VHL* были выявлены в общей сложности у 23 (26%) больных. Все выявленные мутации были соматические, т. е. присутствовали только в опухолевой ткани и не обнаруживались в соответствующих им участках нормальной почечной паренхимы, что наряду с клиническими данными позволило исключить синдром Хиппеля—Линдау и рассматривать имеющиеся образцы как выборку спорадического варианта ПКР. При этом у 15 пациентов наблюдалась только мутация гена *VHL* и у 7 больных только гиперметилирование промотора данного гена. В 1 случае у больного с ПКР отмечались одновременно мутация и метилирование промотора. Мутации гена *VHL* выявлялись у больных только со светлоклеточным вариантом ПКР, в то время как aberrантное метилирование промотора данного гена было выявлено у 5 больных светлоклеточным и у 2 пациентов с папиллярным вариантом ПКР. Ни в одном случае не было выявлено гиперметилирование в гистологически нормальной (неопухоловой) ткани. Частота выявления мутации/метилирования гена *VHL* в зависимости от клинико-морфологических характеристик больных представлена в табл. 2. Среди обнаруженных мутаций ($n = 15$) в 11 (73%) случаях выявлялись делеции, у 2 (13%) пациентов — однонуклеотидные замены, у 1 — инсерция и в 1 случае — комплексная мутация с наличием делеции. В 10 (66,7%) случаях мутации приводили к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов. Мы можем предполагать, что в нашей серии наблюдений все генетические и эпигенетические изменения в гене *VHL* были инактивирующими, поскольку либо приводили к сдвигу рамки считыва-

Таблица 2. Локализация и тип мутации гена VHL

Характеристика мутаций	Число больных, n = 15 (100 %)
Локализация мутации:	
экзон 1	4 (26,7)
экзон 2	5 (33,3)
экзон 3	6 (40)
Тип мутации:	
делеция	11 (73)
инсерция	1 (7)
комплексная мутация с наличием делеции	1 (7)
однонуклеотидные замены	2 (13)

Таблица 3. Частота мутаций и/или гиперметилирования гена VHL в зависимости от клинических характеристик пациентов

Параметр	Число больных с инактивирующими событиями в гене VHL (%)	p
Пол:		
муж., n = 61 (100 %)	16 (26)	0,8
жен., n = 27 (100 %)	7 (26)	
Возраст, лет :		
< 56, n = 45 (100 %)	12 (27)	0,9
≥ 56, n = 43 (100 %)	11 (26)	
Стадия на момент постановки диагноза ПКР:		
I–II, n = 13 (100 %)	5 (38)	0,5
III–IV, n = 64 (100 %)	17 (27)	
Неизвестно, n = 11 (100 %)	1 (9)	
Степень дифференцировки:		
G ₁₋₂ , n = 35 (100 %)	7 (20)	0,5
G ₃₋₄ , n = 33 (100 %)	10 (30)	
Неизвестно, n = 20 (100 %)	6 (30)	
Морфологический тип:		
светлоклеточный, n = 84 (100 %)	21 (25)	0,3
папиллярный, n = 3 (100 %)	2 (67)	

ния ДНК (делеции, инсерции), либо локализовались в тех участках ДНК (миссенс-мутации), которые являются критическими для процесса транскрипции данного гена.

При ИГХ-исследовании во всех 88 случаях экспрессия HIF-1α не была обнаружена в опухолевых клетках (ни в ядерном, ни в цитоплазматическом компартментах). Цитоплазматическая экспрессия была выявлена только в новообразующихся сосудах в об-

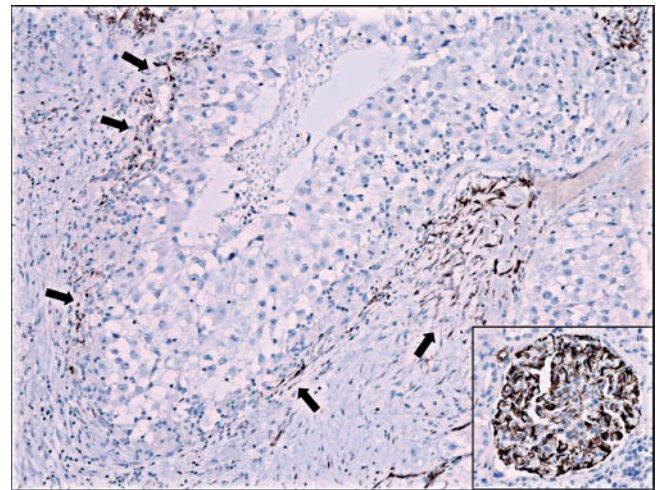


Рис. 1. Экспрессия HIF-1α при сПКР. Экспрессия обнаружена в новообразующихся сосудах из области фронта инвазии опухоли (стрелочки). Опухолевые клетки отрицательны. Вставка: выраженная экспрессия в гломерулярном эндотелии (внутренний положительный контроль)

ласти фронта инвазии опухоли (рис. 1). Ядерная экспрессия не наблюдалась ни в одном типе клеток в пределах исследованного материала.

При анализе частоты инактивирующих событий в гене VHL в зависимости от клинико-морфологических характеристик нами не было выявлено какой-либо ассоциации с полом, возрастом больных, стадией заболевания на момент его диагностирования, морфологическим вариантом и степенью дифференцировки опухоли (табл. 3). Частота повреждений аллеля гена VHL у больных с ранними (I–II) и поздними (III–IV) стадиями заболевания составила 38,5% (5/13) и 26,6% (17/64) соответственно. Отсутствие достоверной разницы между этими показателями позволяет предположить, что молекулярные нарушения в данном гене, вероятно, являются одним из ранних событий в канцерогенезе при ПКР, так как обнаруживаются уже при I–II стадиях заболевания. Несмотря на то что у 3 больных папиллярным вариантом ПКР отсутствовала мутация гена VHL, в 2 случаях определялось гиперметилирование промотора данного гена, которое также могло вызвать его инактивацию.

Мы также проанализировали ассоциацию между статусом гена VHL и локализацией отдаленных метастазов на момент постановки диагноза диссеминированного ПКР (табл. 4). При наличии инактивирующего события в гене VHL у пациентов достоверно чаще наблюдалось метастазирование в ЛУ (48% против 17%) и печень (17% против 0%), чем при отсутствии данных генетических нарушений.

Прогностическая роль молекулярных нарушений в гене VHL и результаты лекарственного лечения. Медиана времени до прогрессирования и медиана продолжительности жизни для всей группы больных

Таблица 4. Локализация метастазов в зависимости от наличия инактивирующих событий в гене VHL

Статус гена VHL	Локализация метастазов					
	Легкие	ЛУ	Кости	Печень	Надпочечники	Мягкие ткани
Мутация/метилирование гена VHL:						
да, n = 23 (100%)	6 (26)	11 (48)	5 (22)	4 (17)	2 (9)	–
нет, n = 65 (100%)	25 (38)	11 (17)	9 (14)	–	2 (3)	2 (3)
<i>p</i>	0,2	0,004	0,2	0,003	0,9	0,6

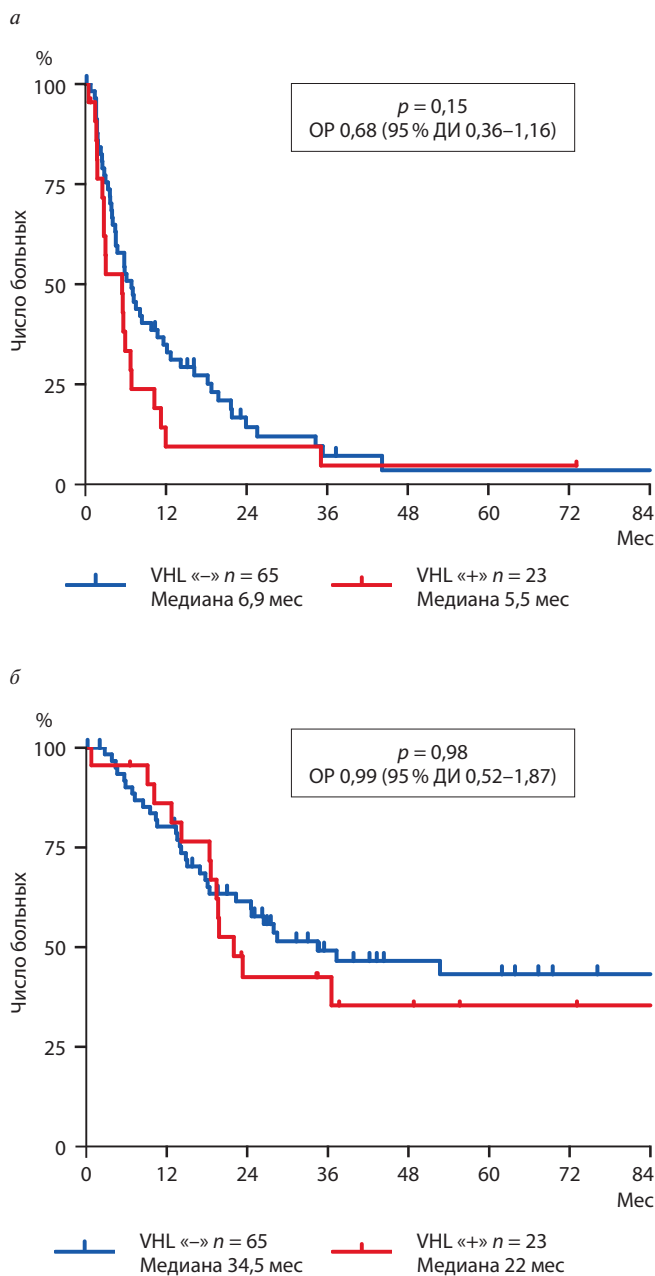


Рис. 2. Время до прогрессирования (А) и ОВ (Б) больных мПКР в зависимости от инактивирующих нарушений в гене VHL. VHL «+» — наличие инактивирующих событий в VHL; VHL «-» — отсутствие генетических нарушений в VHL

(n = 88) составили 5,8 и 26,7 мес соответственно. Медиана времени наблюдения за больными, которые продолжают наблюдаться (n = 32), достигла 34 (2–127) мес. Проведенный анализ продемонстрировал, что время до прогрессирования и ОВ для всей группы больных, включенных в данное исследование, не зависят от статуса гена VHL (рис. 2). Мы отдельно проанализировали результаты лечения и показатели выживаемости пациентов в подгруппах, получавших иммунотерапию с включением ИФН и таргетную антиангиогенную терапию с включением ингибиторов VEGFR.

Частота полной (ПР) и частичной ремиссии (ЧР) среди 53 пациентов, получавших различные режимы иммунотерапии с включением ИФН, в качестве 1-й линии лекарственного лечения, составила 15% (n = 8). В 19% случаев наблюдалась длительная (≥ 6 мес) стабилизация процесса. Медиана времени до прогрессирования и медиана продолжительности жизни пациентов в данной группе составили 5,7 и 20 мес соответственно. У 10 (19%) больных наблюдались нарушения в гене VHL. При оценке влияния инактивирующих событий в гене VHL на результаты иммунотерапии нами не было выявлено достоверных различий в частоте объективных эффектов, времени до прогрессирования и ОВ между подгруппами пациентов с нормальным (VHL «-») и поврежденным (VHL «+») геном VHL (табл. 5).

В подгруппе пациентов, которым проводилась таргетная антиангиогенная терапия (n = 35), частота объективных эффектов достигла 26% при медиане времени до прогрессирования 5,9 мес. Медиана продолжительности жизни не достигнута; 15 больных продолжают наблюдаться при медиане времени наблюдения 33 мес (2,2–39 мес). У 13 из 35 пациентов были зарегистрированы те или иные инактивирующие VHL-нарушения. Группы пациентов с наличием (n = 13) и отсутствием (n = 22) генетических нарушений были сбалансированы по основным прогностическим характеристикам в соответствии с моделью MSKCC. Эффективность антиангиогенной терапии и выживаемость больных мПКР не зависела от статуса гена VHL, хотя прослеживалась тенденция к увеличению частоты объективных эффектов и медианы вре-

Таблица 5. Результаты иммунотерапии в зависимости от статуса гена *VHL*

Эффективность иммунотерапии	Число больных, n = 53 (%)	<i>VHL</i> «-» больные*, n = 43 (%)	<i>VHL</i> «+» больные*, n = 10 (%)	<i>p</i>
ПР	2 (4)	2 (5)	—	0,8
ЧР	6 (12)	5 (12)	1 (10)	0,7
Клинический эффект (ПР+ЧР+стабилизация > 6 мес)	18 (34)	16 (37)	2 (20)	0,5
Время до прогрессирования (медиана), мес	5,7	6,1	4,3	0,8
Продолжительность жизни (медиана), мес	20	20,3	23,3	0,76

Примечание. **VHL* «-» — отсутствуют генетические нарушения; *VHL*«-» — инактивирующие события.

Таблица 6. Результаты таргетной терапии в зависимости от статуса гена *VHL*

Параметр	Общее число больных, n = 35 (100 %)	<i>VHL</i> «-» больные, n = 22 (100 %)	<i>VHL</i> «+» больные, n = 13 (100 %)	<i>p</i>
Прогностическая группа (MSKCC)				0,8
Благоприятный прогноз	13 (37)	8 (36)	5 (38)	
Промежуточный прогноз	22 (63)	14 (64)	8 (62)	
ПР	—	—	—	
ЧР	9 (26)	7 (32)	2 (15)	0,5
Клинический эффект (ПР + ЧР + стабилизация > 6 мес)	23 (66)	15 (68)	8 (62)	0,9
Время до прогрессирования (медиана), мес	5,9	11,0	6,0	0,5
Продолжительность жизни (медиана), мес	Не достигнута	Не достигнута	19	0,4

мени до прогрессирования с 15 до 32% и с 6 до 11 мес соответственно у больных без инактивирующих нарушений в данном гене (табл. 6).

Обсуждение

Проведенный анализ продемонстрировал относительно невысокую частоту (26%) инактивирующих событий (мутации/гиперметилирование промотора) в гене *VHL* в данной выборке больных диссеминированным ПКР. Так же как и в других работах, мы не выявили ассоциации между стадией заболевания на момент диагностирования ПКР и частотой инактивирующих нарушений *VHL*. Данное наблюдение еще раз подтверждает, что инактивация в гене *VHL* является ранним генетическим нарушением, возникающим на начальных стадиях заболевания. Несмотря на то что мутации *VHL* встречались только при светлоклеточных вариантах ПКР, у 2 из 3 пациентов с папиллярным раком наблюдалось гиперметилирование промотора гена *VHL*. И хотя для папиллярного рака почки характерны собственные молекулярные нарушения (мутация, амплификация *MET*-протоонкогена), данное наблюдение может указывать

на возможные общие генетические нарушения при обоих гистологических вариантах ПКР.

Поскольку у всех больных, включенных в данный анализ, отмечалась диссеминация процесса, мы проанализировали влияние инактивирующих событий в гене *VHL* на характер метастазирования. При наличии нарушений *VHL* частота метастазирования в ЛУ и печень была достоверно выше. Данная ассоциация не исключает влияния нарушений *VHL* на путь метастазирования, хотя может быть также связана с небольшим числом больных, включенных в исследование. Несмотря на то что отмечалась тенденция к увеличению продолжительности жизни больных без инактивирующих событий в гене *VHL* в сравнении с группой с мутированным или гиперметилированным геном — медиана 34,5 и 22 мес соответственно, разница в показателях не достигла статистической значимости (*p* = 0,98). Мы не проводили сравнительного анализа эффективности иммунотерапевтического и таргетного подходов, поскольку, во-первых, преимущество таргетной терапии перед ИФН с точки зрения увеличения частоты объективных эффектов и времени до прогрессирования уже доказано в ходе хорошо

спланированных рандомизированных исследований. Во-вторых, в иммунотерапевтической группе мы не располагали в полном объеме всеми прогностическими параметрами (ЛДГ — лактатдегидрогеназы, Са — кальция), необходимыми для стратификации пациентов в группы риска и, соответственно, сравнение показателей выживаемости в иммунотерапевтической группе с результатами лечения пациентов, получавших таргетную терапию, было бы некорректным. Проведенный анализ не выявил также явной зависимости между наличием нарушений *VHL* и эффективностью иммунотерапии или антиангиогенной терапии. Отсутствие ассоциации между нарушениями *VHL* и продолжительностью жизни пациентов ($n = 53$), которые получали только иммунотерапию, может указывать на то, что данные генетические нарушения не имеют прогностической значимости с точки зрения естественного течения опухолевого процесса с момента диагностирования отдаленных метастазов, хотя ИФН также обладают некоторой антиангиогенной активностью. В то же время в группе пациентов, получавших различные варианты таргетной терапии ($n = 35$), прослеживалась тенденция к увеличению времени до прогрессирования и ОВ у больных без инактивирующих изменений в гене *VHL*. С учетом того, что подгруппы пациентов с наличием и отсутствием генетических нарушений были хорошо сбалансированы по своим прогностическим характеристикам, можно предполагать большую эффективность таргетного лекарственного подхода у пациентов с неизменной функцией гена *VHL*. Данное наблюдение несколько противоречит доступным на сегодняшний день результатам 2 других исследований, в которых отмечалась обратная тенденция [15, 16]. Частота объективных эффектов и время до прогрессирования при использовании антиангиогенного подхода, наоборот, были выше у больных с наличием инактивирующих событий в гене *VHL*. И хотя в этих исследованиях также не было выявлено статистически достоверной ассоциации между наличием генетических нарушений в *VHL* и эффективностью таргетной терапии, в целом подобная тенденция соответствовала представлениям о большей эффективности патогенетически обоснованной терапии у пациентов с функциональными нарушениями *VHL*.

Как известно, мутации и другие инактивирующие события в гене *VHL* не являются единственным возможным регулятором проангиогенного сигнала, реализуемого через данный сигнальный путь. При нормально функционирующем гене стимуляция ангиогенеза также возможна вследствие гиперпродукции транскрипционного фактора HIF-1/2 α . Уровень данного фактора внутри клетки при сПКР может регулироваться не только на посттрансляционной (после синтеза) стадии с помощью pVHL, но и за счет гиперактивации сигнального пути PI3K-AKT-mTOR, непо-

средственно стимулирующего биосинтез HIF- α в избыточном количестве. Видимо, поэтому назначение ингибиторов VEGF/VEGFR может иметь успех даже при отсутствии мутации *VHL*.

Данная гипотеза подтверждается результатами клинического исследования, в котором у больных ПКР *in vivo* изучалась связь между мутациями *VHL*, гиперэкспрессией HIF и VEGF, измеряемых ИГХ-методом и методом Вестерн-блоттинга [10]. Несмотря на то что между этими показателями существовала прямая корреляционная зависимость, в 14% случаев гиперэкспрессия HIF-1 в ядрах опухолевых клеток наблюдалась без мутации *VHL*, что свидетельствует о существовании альтернативных механизмов регулирования концентрации HIF. Таким образом, внутриклеточный уровень HIF как ключевого элемента сигнального пути, отвечающего за неоангиогенез, может также служить дополнительным или самостоятельным прогностическим маркером. По немногочисленным данным литературы, при использовании ИГХ-метода для оценки уровня экспрессии HIF гиперэкспрессия указанного фактора ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом у больных диссеминированными формами ПКР [17]. То же самое наблюдается при раке шейки матки и при раке молочной железы, где повышение внутриклеточного уровня HIF служит фактором неблагоприятного прогноза, несмотря на отсутствие мутации в гене *VHL*. Вероятно, гиперпродукция данного фактора позволяет приобрести опухолевым клеткам в процессе деления более агрессивный фенотип и резистентность к лекарственной терапии, поскольку они легче адаптируются к условиям гипоксии [18,19]. К сожалению, нами не была обнаружена экспрессия HIF-1 α в ни в ядрах, ни в цитоплазме опухолевых клеток. Используя антитела клона H1 α 67, мы смогли только выявить неоангиогенез в области фронта инвазии опухоли. Выявленные различия с данными литературы, вероятно, отражают различия в методологических подходах к изучению экспрессии с помощью H1 α 67.

Еще одним недостатком данного анализа является использование для генетического исследования опухолевого материала, полученного преимущественно из первичной опухоли на различных стадиях заболевания. Мы не смогли найти в доступных литературных источниках анализа, в котором бы изучалась частота встречаемости инактивирующих событий в гене *VHL* в метастазах ПКР. В нашей серии наблюдений у 2 больных состояние данного гена оценивалось в опухолевой ткани из удаленных метастазов. Ни в одном из этих случаев не было выявлено инактивирующих нарушений. Возможно, что состояние первичной опухоли не в полной мере отражает характер генетических нарушений в метастазах.

Тем не менее бесспорное преимущество данного исследования заключается в анализе генетических нарушений в относительно однородной выборке больных с точки зрения степени распространенности опухолевого процесса — у всех пациентов терапия проводилась с момента диагностирования отдаленных метастазов. Результаты исследования указывают, что нарушения в гене *VHL* инактивирующего характера в данной серии наблюдений не являлись факторами, достоверно прогнозирующими течение заболевания на этапе его диссеминации, и критерием, определяющим эффективность как иммунотерапии, так и таргетной антиангиогенной терапии.

Очевидно, процессы регуляции уровня ростовых факторов, ответственных за ангиогенез и пролиферативную активность клеток, многообразны и не сводятся к функционированию единственного сигнального пути (АКТ/mTOR/HIF/VEGF, PDGF), которому уделяется в настоящее время больше всего внимания. Например, уровень экспрессии опухоли VEGF может также регулироваться с помощью других сигнальных

систем, в том числе зависеть от состояния гена *TP53* или изменения внутриклеточного уровня оксида нитрата, т. е. существуют альтернативные VHL/HIF-независимые механизмы регулирования концентрации VEGF и неангиогенеза в целом [10]. На это косвенно указывает эффективность анти-VEGF/VEGFR-терапии при других видах опухолей — рака печени, рака толстой кишки, которые в меньшей степени ассоциированы с дисфункцией HIF и/или мутацией в гене *VHL* [20–22]. 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 [10, 20–22]. Поэтому вряд ли можно ожидать, что какое-либо одно молекулярно-генетическое нарушение при ПКР будет единственным фактором, прогнозирующим течение данного заболевания, или служить маркером, предсказывающим эффективность того или иного лекарственного подхода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михайленко Д.С., Григорьева М.В., Землякова В.В. и др. Молекулярно-генетические нарушения в гене *VHL* и метилирование некоторых генов супрессоров в спорадических светлоклеточных карциномах почки. *Онкоурология* 2010;(2):32–6.
2. Bukowski R.M. Natural history and therapy of metastatic renal cell carcinoma. The role of interleukin-2. *Cancer* 1997;80:1198–220.
3. Lonsler R.R., Glenn G.M., Walther M. et al. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003;361:2059–67.
4. Latif F., Tory K., Gnarr J. et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317–20.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Shuin T., Kondo K., Toriogo 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.
9. Kondo K., Yao M., Yoshida M. et al. Comprehensive mutational analysis of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: relationship to clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:58–68.
10. Nuan X., Rian C., Messing E. et al. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to VHL tumor suppressor gene mutations and hypoxia-unducible factor-1a expression in renal cell carcinoma. *J Urology* 2003;170:588–92.
11. 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.
12. Patard J.J., Fergelot P., Karakiewicz P.I. et al. Low CAIX 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7388–93.
18. Birner P., Schindl M., Obermair A., Plank C. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1a is a marker for an unfavourable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693–6.
19. Schindl M., Schoppmann S.F., Samonigg H. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1a is associated with an unfavourable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1831–7.
20. 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.
21. 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.
22. Lovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90.