

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства образования и науки Российской Федерации

На правах рукописи

Гуррам Нажа

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И
РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ**

14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология

диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.б.н., проф. Новиков В.В.
д.м.н., проф. Академик РАН., Караулов А.В.

Москва, 2018
ОГЛАВЛЕНИЕ

<u>ВВЕДЕНИЕ</u>	<u>4</u>
<u>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</u>	<u>10</u>
<u>1.1. Основы канцерогенеза</u>	<u>10</u>
<u>1.2. Характеристика рака почки</u>	<u>12</u>

1.3. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы	15
1.4. Опухолевые антигены	19
1.4.1. Характеристика дифференцировочных молекул клеток иммунной системы	19
1.4.1.1. молекула межклеточной адгезии ICAM-1.....	20
1.4.1.2. Альфа-цепь рецептора интерлейкина-2.....	23
1.4.1.3. Иницирующая апоптоз молекула Fas	27
1.4.2. Характеристика основных групп раково-тестикулярных генов.....	30
1.4.2.1. Суперсемейства генов MAGE.....	33
1.4.2.2. Суперсемейство генов GAGE/PAGE/XAGE	35
1.4.2.3. Семейство генов HAGE	38
1.4.2.4. Семейство генов CTAG.....	39
1.4.2.5. Семейство генов CSAGE.....	40
1.4.2.6. Семейство генов RAGE.....	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Материалы исследования	45
2.2. Методы исследования.....	53
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	61
3-1. Анализ экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ	61
3.2. Характеристика экспрессии гена RAGE.....	74
3.2.1. Разработка методики обнаружения вариантов мРНК RAGE	74
3.2.2. Исследование частоты обнаружения мРНК RAGE в периферической крови и в опухолевых очагах больных раком почки	80
3.2.3. Сравнение спектров экспрессии мРНК RAGE при различных злокачественных новообразованиях	84
3.3. Сравнение спектров экспрессии мРНК раково-тестикулярных генов в крови и в образцах опухолей больных раком почки.....	89
3.4. Сравнительный анализ паттернов генов ICAM-1, IL-2R α и Fas и раково-тестикулярных генов	99
3.5. Сывороточное содержание растворимых молекул дифференцировочных молекул у больных раком почки.....	105

<u>4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</u>	<u>113</u>
<u>5. ВЫВОДЫ.....</u>	<u>128</u>
<u>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</u>	<u>129</u>
<u>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</u>	<u>130</u>
<u>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</u>	<u>131</u>

ВВЕДЕНИЕ

Развитие злокачественных опухолей, в частности, рака почки, и взаимосвязанное с ним изменение уровня функциональной активности клеток иммунной системы сопровождается изменениями в уровне транскрипции генов, в альтернативном сплайсинге, не характерном для нормы, что приводит к формированию специфичного для заболевания пула белков.

Частота рака почки составляет 3% от злокачественных новообразований, он весьма химио- и радиорезистентен. Однако, как предполагается, он является иммуногенным, так как были зарегистрированы случаи спонтанных регрессий (R. Amitabh et al., 2014; T. Salman et al., 2016). Поиск молекулярных маркеров, позволяющих прогнозировать характер течения заболевания, сохраняет свою актуальность. Идентификация новых, ассоциированных с прогрессией рака почки, биомолекул способна раскрыть новые аспекты молекулярных механизмов развития этого заболевания и расширить арсенал потенциальных диагностических, прогностических и терапевтических мишеней.

Онкологический процесс сопровождается изменениями транскриптома как опухолевых клеток, так и клеток иммунной системы. Среди наиболее важных и

известных генов, вовлеченных в противоопухолевый иммунитет, находятся гены, кодирующие молекулу межклеточной адгезии ICAM-1 (CD54), молекулу активации альфа-цепь рецептора интерлейкина-2 IL-2R α (CD25) и молекулу, опосредующую апоптоз Fas (CD95). Транскрипция этих генов в норме и при развитии онкопатологии приводит к изменениям как в уровне кодируемой ими мРНК, так и к изменениям в спектрах альтернативных форм мРНК. Это определяет возможность использования продуцируемых данными генами мРНК в качестве биомаркеров, имеющих потенциальную мониторинговую значимость. К категории биомаркеров относят также растворимые формы дифференцировочных молекул клеток иммунной системы, в том числе растворимые молекулы ICAM-1, IL-2R α и Fas, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического шеддинга как механизма посттрансляционной модификации белков.

Ярким отражением изменений транскриптома, возникающих при злокачественном перерождении клеток, является появление продуктов экспрессии раково-тестикулярных генов. Они кодируют антигены, являющиеся иммунодоминантными белками, на которые активно отвечает иммунная система (A. Sardaro et al., 2016). Сопоставление характера их экспрессии в крови и опухолевых очагах больных раком почки с экспрессией генов, участвующих в иммунных реакциях, дает возможность получить дополнительную информацию о молекулярных механизмах взаимоотношений между злокачественным новообразованием и иммунным ответом на опухоль у больных раком почки.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день нет достоверных прогностических факторов, обладающих необходимой чувствительностью и специфичностью, при ранней диагностике или выборе тактики лечения рака почки, что заставляет продолжать исследования в этом направлении. Применение классических прогностических факторов, таких как размер опухоли, стадия заболевания, степень

дифференцировки опухолевых клеток, основано на статистических данных и далеко не всегда позволяет прогнозировать течение рака почки. Достижения молекулярной биологии позволили более полно узнать механизмы канцерогенеза и выделить некоторые ключевые этапы. Определены новые показатели опухолевой агрессии, клиническая ценность которых до конца не ясна. Проведение дальнейших исследований по поиску и изучению биомаркеров течения рака почки, перспективных для использования в мониторинге течения заболевания, представляется нам актуальным.

Цель исследования. Изучение при раке почки особенностей транскриптома крови и опухолевых очагов, связанных с экспрессией генов, вовлеченных в иммунный ответ, и экспрессией раково-тестикулярных генов.

Задачи исследования.

1 Изучить частоту обнаружения альтернативных форм мРНК ICAM-1 (CD54), IL-2R α (CD25) и Fas (CD95) в крови и опухолевых очагах на разных стадиях развития рака почки.

2 Провести сравнительный анализ встречаемости альтернативных вариантов мРНК RAGE при раке почки и различных формах злокачественных новообразований.

3 Определить частоту встречаемости в крови и опухолевых очагах мРНК раково-тестикулярных генов на разных стадиях развития заболевания.

4 Провести сравнительный анализ встречаемости мРНК ICAM-1, IL-2R α и Fas и мРНК раково-тестикулярных генов, в том числе мРНК RAGE, при раке почки.

5 Изучить содержание растворимых молекул CD54, CD25 и CD95 в сыворотке крови больных раком почки в сопоставлении со встречаемостью альтернативных форм мРНК генов иммунного ответа и раково-тестикулярных генов.

Научная новизна работы.

Впервые продемонстрировано присутствие альтернативных форм мРНК ICAM-1, IL-2R α и Fas в опухолевых очагах и крови больных раком почки и показано, что альтернативная форма мРНК ICAM-1 выявлялась в опухолевых очагах только в отсутствии метастазов. Присутствие альтернативной формы мРНК IL-2R α (CD25Exo4-5Del) сочетается с благоприятным течением рака почки.

Впервые показано, что мРНК CD25Exo4-5Del определяется чаще в опухолевых очагах, содержащих CD54TMDel и CD95Exo6Del; мРНК CD95Exo6Del встречалась чаще в опухолях, содержащих CD54TMDel; а мРНК Fas встречалась чаще в образцах, содержащих мРНК CD54TMDel или CD25Exo4-5Del.

Впервые показано, что при наличии в транскриптом опухоли больных раком почки мРНК TRAG-3 статистически значимо чаще встречалась мРНК CD95. Кроме того, образцы, не содержащие мРНК RAGE-1, статистически значимо чаще содержали мРНК CD54 и CD95 и CD54TMDel. Форма CD54TMDel обнаруживалась также чаще в опухолевых очагах рака почки, не содержащих мРНК RAGE-4. Форма мРНК CD25Exo4Del чаще обнаруживалась в образцах, не содержащих мРНК NY-ESO-1.

Впервые обнаружено, что особенности экспрессии генов ICAM-1 и IL-2R α , связанные с продукцией альтернативных форм мРНК в опухолях больных раком почки, отражаются на сывороточном содержании растворимых молекул CD54 и CD25.

Впервые показано, что альтернативные варианты мРНК RAGE встречаются при раке почки чаще, чем при раке тела матки, толстой кишки и раке легкого. Матричная РНК RAGE-4 встречается у больных раком почки значительно чаще, чем мРНК тестируемых раково-тестикулярных генов. Во многих случаях обнаруживаются мРНК HAGE и TRAG-3.

Впервые показано, что присутствие мРНК TRAG-3, которое ассоциировано с благоприятным течением рака почки, сопровождается высокой

частотой обнаружения мРНК Fas, что связано с повышением чувствительности клеток опухолевого очага к Fas-опосредованному апоптозу, и указывает на положительную регуляторную роль TRAG-3 в экспрессии Fas гена.

Впервые продемонстрировано, что транскриптом клеток опухолевых очагов, характеризующийся отсутствием мРНК RAGE-1, статистически значимо чаще содержит мРНК полноразмерной формы CD95 и альтернативных форм CD54 и CD25.

Теоретическая и практическая значимость работы

В теоретическом плане работа вносит вклад в исследования по поиску и изучению биомаркеров течения рака почки. Показано, что различия в частоте встречаемости альтернативных форм мРНК вовлеченных в иммунный ответ генов ICAM-1, IL-2R α и Fas сочетаются с различиями в особенностях течения рака почки, что связано с вариабельностью реализации молекулярных механизмов иммунного ответа больных. Так, изменения в сывороточном содержании оказывающих иммуномодулирующий эффект растворимых молекул CD54 и CD25 сочетаются с разными спектрами альтернативных форм мРНК CD25 и CD54, детектируемыми в опухолевых очагах. Кроме того, изучение особенностей транскриптома опухолевых очагов больных раком почки показало, что экспрессия ряда раково-тестикулярных генов, таких как TRAG-3, NY-ESO-1, RAGE-1, RAGE-4 ассоциирована с экспрессией отдельных альтернативных форм мРНК генов ICAM-1, IL-2R α и Fas.

Полученные в ходе выполнения работы данные позволили выделить несколько новых биомаркеров течения рака почки, перспективных для использования в мониторинге течения заболевания. Так, наличие альтернативной формы мРНК ICAM-1, мРНК CD25Exo4-5Del, XAGE-1a-b и TRAG-3 в опухолях почки свидетельствует о благоприятном течении, а присутствие мРНК RAGE-4, MAGE-C1, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1 и MAGE-A(1-6) сочетается с неблагоприятным характером развития рака почки.

Детекция мРНК указанных генов может быть использована для ранней диагностики рака почки. Полученные данные могут быть применены в преподавании курсов по биохимии и иммунологии для студентов вузов биологического и медицинского профиля.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлены изменения сывороточного содержания sCD95 при раке почки. При прогрессии заболевания повышается сывороточное содержание растворимых форм молекул CD25, CD54 и CD95.
2. Наличие в опухолевых очагах альтернативных форм мРНК CD25 и CD54, которое сочеталось с благоприятным течением рака почки, влияет на сывороточное содержание растворимых дифференцировочных молекул CD25 и CD54.
3. Особенности транскриптома крови и опухолевых очагов при раке почки являются высокая частота встречаемости у больных альтернативных вариантов мРНК RAGE. Наличие мРНК RAGE-4, MAGE-C1 и NY-ESO-1 в опухолях почки сочеталось с неблагоприятным течением, а мРНК XAGE-1a-b и TRAG-3 – с благоприятным течением рака почки. Присутствие альтернативных вариантов мРНК RAGE сочетается с наличием метастазов и наличием низкодифференцированных опухолей.

Личный вклад автора в получение результатов

Сбор и анализ материалов специальной литературы, составление плана исследования, культуральные исследования, статистическая обработка и систематизация результатов работы, а также написание основных публикаций были проведены лично автором. На основе анализа полученных лично данных автор сформулировал выводы и практические рекомендации.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности результатов работы свидетельствует использование сертифицированных иммунологических, молекулярно-биологических методов, а

также методов статистической обработки результатов, характеризующихся высокой чувствительностью и специфичностью. Проведен достаточный объем исследований. Диссертационная работа была апробирована на заседании кафедры молекулярной биологии и иммунологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (протокол № 8 от 22.03.2017 года).

Результаты работы были представлены на III Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, 2010), IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Нижний Новгород, 2010), XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Нижний Новгород, 2012), XII Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013), VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Объединенный иммунологический форум» (Нижний Новгород, 2013), II Петербургском Онкологическом Форуме с международным участием (Санкт-Петербург, 2016), Межрегионарном форуме с международным участием «Клиническая иммунология и аллергология, междисциплинарные проблемы» (Казань, 2016), III Петербургском Онкологическом Форуме с международным участием (Санкт Петербург, 2017).

Внедрение результатов исследования.

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедре молекулярной биологии и иммунологии при преподавании курса «Молекулярная иммунология» в Институте биологии и биомедицины Национального

Исследовательского Нижегородского Государственного Университета им. Н.И. Лобачевского а также в работе Городской клинической больницы № 10 Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Нижегородской области.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 10 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа в объеме 159 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками и 27 таблицами. Список литературы включает 248 источников литературы (24 отечественных и 224 иностранных).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Основы канцерогенеза

Опухоль или неоплазия - это патологический процесс, представленный новообразованной тканью, больше не отвечающей нормальным механизмам регуляции. Канцерогенез, или процесс зарождения и развития опухоли, вовлекает совокупность сложных событий, в течение которых изменения в экспрессии генов клеток приводят к нарушению регуляции их роста и дифференцировки.

Опухолевая трансформация клеток вовлекает множество генов, называемых онкогенов у которых стандартная функция – регуляция процессов жизнедеятельности клеток [21]. В целом эти гены стимулируют клеточный рост и деление, процессы нуклеинового обмена и апоптоза. Активность онкогенов в

опухолевых клетках выше, чем в нормальных. Считается, что активизация онкогенов приводит к злокачественной трансформации клеток [123].

В опухолевых клетках экспрессия генов отклоняется от нормы что приводит к изменению транскриптома и протеома этих клеток. Генетические перестройки могут происходить под действием канцерогенных агентов как в соматической, так и в половой клетке. При этом четыре класса онкогенов являются мишенями канцерогенных агентов: протоонкогены - регуляторы пролиферации и дифференцировки клеток; гены супрессоры опухолевого роста – антионкогены, ингибирующие пролиферацию клеток; гены, участвующие в гибели клеток путем апоптоза; и гены, отвечающие за процессы репарации ДНК.

Процесс превращения нормальной клетки в злокачественную получил название малигнизаций. Она происходит в результате многоэтапного процесса повреждения генетического аппарата клетки, в том числе долговременные накопления хромосомных aberrаций и соматических мутаций, реактивации молчащих эмбриональных генов, усилении или подавления функционирования нормальных генов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток, а также появление новых генов, как в случае вирусной индукции канцерогенеза [9].

Общепризнанно, что изменение уровня экспрессии генов, модифицированных генетически или эпигенетически по структуре, является одной из форм проявления дефектов геномной ДНК при раке [21]. Анализ изменений в содержании мРНК (и/или белка) специфических генов используют для раннего выявления рака, определения прогноза и предсказания терапевтического ответа. Профиль экспрессии генов в опухоли абсолютно изменен по сравнению с нормальной тканью, поэтому определенные сочетания генов, теряющих свою экспрессию, или, наоборот, гиперэкспрессирующихся в конкретном типе опухоли, могут являться диагностическими и прогностическими маркерами.

Основные характеристики злокачественной клетки: неконтролируемый рост, нарушения в программе клеточной дифференцировки, нарушения в программе клеточной смерти, усиление механизмов устойчивости к неблагоприятным воздействиям и способность к иммортализации, инвазии и метастазированию. Метастазирование – типичная особенность злокачественных новообразований, включающая в себя, с одной стороны, потерю экспрессии или функции молекул, ответственных за межклеточную адгезию (таких как CD18, CD54) и, с другой стороны, приобретение способности к миграции, стимулируемой факторами роста, и деградация элементов внеклеточного матрикса с помощью выделяемых ими протеаз, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММР), что позволяет опухолевым клеткам пересекать базальную пластинку, которая ранее ограничивала первичную опухоль (интравасация). Раковые клетки могут двигаться как с током крови (диссеминация), так и самостоятельно, проходя через любые барьеры (экстравазация), и оседая в любом месте (эмболия), порождая там вторичный опухолевый очаг. Для разных опухолей характерны разные типы метастазирования, разные органы, в которые происходит метастазирование, что определяется взаимодействием рецепторных систем опухолевых клеток и клеток органа-мишени. Гистологический тип метастазов такой же, как и опухоли в первичном очаге, однако, опухолевые клетки метастазов могут становиться более зрелыми или, наоборот, менее дифференцированными. Метастатические опухоли обычно растут быстрее первичных, и следственно могут стать объемнее их [37].

По темпам роста большинство злокачественных опухолей превосходят доброкачественные и, как правило, могут достигать значительных размеров в недолгие сроки. Каждая определенная опухоль единственна по набору патологических изменений, так же как и геном каждого конкретного пациента. Большинство типов опухолей имеют большой риск повторов, даже при ранней

диагностике и резекции первичного очага поражения. Среди всех онкологических заболеваний, встречаются чаще рак предстательной железы и лёгких у мужчин и рак молочной железы у женщин [112]. После сердечно-сосудистых заболеваний, рак является второй причиной смертности в мире. Одной из относительно редких форм рака является рак почки.

1.2 Характеристика рака почки

Почечно-клеточный рак является самым распространенным вариантом опухоли почек у взрослых, чаще всего произрастающим из эпителия проксимальных канальцев нефрона. Впервые описан в 1883 г. немецким врачом-патологом Паулем Гравицем под названием «гипернефрома». Раком почки наиболее часто страдают люди в возрасте 50-70 лет с приблизительной средней 5-летней выживаемостью, вместе с тем у мужчин он обнаруживается в два раза чаще, чем у женщин. Рак почки является седьмой по распространенности формой рака у женщин и пятой у мужчин [112]. Так, в 2013 году в России было зарегистрировано более 337 000 случаев и 143 369 человек умерло вследствие заболевания [2]. За последнее десятилетие заболеваемость в России возросла на треть. Несмотря на то, что заболевание преимущественно встречается у пожилых людей, наблюдались случаи выявления заболевания у лиц молодого возраста. Это касается и детей, у которых болезнь имеет смешанный характер и называется опухолью Вильмса.

Причина рака почки не известна. Однако можно выделить целый ряд факторов риска этого заболевания, начиная с курения, ожирения, химического загрязнения окружающей среды, применения гормональных препаратов, вирусоносительства и завершая наследственным фактором [146]. Среди всех опухолей почек около 95% занимает почечно-клеточный рак, также называемый аденокарцинома почки или светлоклеточная карцинома. Остальные опухоли почки (папиллярная, хромофобная, онкоцитарная, рак собирательных протоков) встречаются значительно реже. За этими гистологическими различиями стоят

разные молекулярно-генетические нарушения, которые обуславливают возникновение и развитие опухоли, а также позволяют прогнозировать течение заболевания [8].

Эпигенетические изменения являются отличительной характеристикой раковых клеток и их роль в почечной опухоли считают все более важной. Аберрантное метилирование ДНК (наиболее часто метилированные гены при раке почки – это гены *APAF1*, *RASSF1*, *VHL*) [33, 56], изменения хроматина/гистонов (метилирование, ацетилирование, убиквитилирование и фосфорилирования) [115], мутации и изменения экспрессии генов, таких как *VHL* и *RASSF1* и дерегуляция экспрессии *microRNA*, таких как *miR-1233* и *miR-32* [33, 237], все эти эпигенетические изменения могут способствовать не только появлению и прогрессированию рака почки, но в силу своей вездесущности, они также представляют собой перспективный класс биомаркеров, предназначенных для диагностики, оценки прогноза течения и ответа на терапию [212].

В настоящее время проводятся исследования большого количества молекулярных маркеров, включая такие как углеводная ангидраза 9 (*G250*), метаболический онкомаркер *TuM2-РК*, сосудистый эндотелиальный фактор роста (*VEGF*), молекула клеточной адгезии *CD44* и др [142, 197]. Однако их использование в клинической практике ограничено ввиду недостаточности данных об их эффективности. Известен ряд молекулярных маркеров, показавших свою прогностическую ценность при раке почки, среди них плоидность ДНК [150], делеции или транслокации третьей хромосомы, потеря гетерозиготности 14 хромосомы (14q LOH: Loss of heterozygosity) [78, 164], повышение уровня экспрессии маркеров пролиферативной активности клеток (*PCNA* и *Ki-67*) [179] и повышение содержания апоптотических маркеров, таких как *Bcl-2* и *p53* [226].

Рак почки остается высоко устойчивым к лечению. Единственно радикальным методом лечения является хирургическое вмешательство -

нефрэктомия (удаление почки). Но возможности хирургического лечения при диссеминированном раке почки ограничены. Длительное бессимптомное течение затрудняет раннюю диагностику этого заболевания, что негативно сказывается на результатах лечения. Тем не менее, разработка методов мониторинга и способов ранней диагностики рака почки является актуальной задачей.

Рак почки чувствителен к атакам со стороны иммунной системы. Первичные опухоли почек, как правило, инфильтрованные Т-лимфоцитами, показывающими цитолитическую активность в отношении опухолевых клеток, а метастатические поражения регрессируют спонтанно с частотой до 7% случаев [200, 30]. При клинических испытаниях ряда рекомбинантных моноклональных антител, в частности IWX-G250, а также дендритных вакцин для лечения рака почки показан их терапевтический эффект [126]. Успешное применение интерлейкина-2 и/или интерферона-альфа для лечения больных с метастатическим раком почки указывает на способность опухоли отвечать на иммунотерапию [206, 178]. Эти данные свидетельствуют о том, что опухоли почек экспрессируют антигены, которые могут быть распознаны Т-лимфоцитами, потенциально способными элиминировать опухолевые клетки. В целях иммунотерапии, самое главное для успешного использования опухолевых антигенов являются: адекватная экспрессия гена в клетках опухолей, достаточная концентрация антигена в опухоли для эффективного узнавания цитотоксическими Т-клетками и сохранение антигена на протяжении всего периода прогрессирования заболевания [175, 192]. Отсутствие или низкая экспрессия опухолевых генов может привести к слабому иммунному ответу [155]. Это предполагает, что иммунотерапевтические подходы представляют собой многообещающую стратегию для лечения пациентов с раком почки [40].

1.3 Взаимоотношение опухоли и иммунной системы

Вследствие беспрерывно идущего в организме мутагенеза всегда возникают злокачественно трансформированные клетки, способные дать начало новообразования. Опухолевые клетки несут чужеродную генетическую информацию и, вызывают реакцию иммунной системы [15]. Современные концепции взаимодействия опухоли и организма исходят из имеющихся фактов об участии в противоопухолевой защите как факторов врожденного иммунитета, так и адаптивного иммунитета [7].

В реакциях противоопухолевого иммунитета задействованы практически все субпопуляции иммунокомпетентных клеток, среди которых доминирующая роль принадлежит цитотоксическим и хелперным Т-лимфоцитам. Связанные с молекулами гистосовместимости I класса пептидные фрагменты поверхностных белков трансформированных клеток распознаются CD8 Т-клетками с помощью расположенного на мембране последних Т-клеточного рецептора [15]. Это приводит к реализации прямой киллерной функции и уничтожению опухолевых клеток посредством продукции перфоринов, гранзимов и индукции апоптоза через систему «Fas - Fas-лиганд» [15, 24]. Фрагменты, гибнущих путем апоптоза опухолевых клеток уничтожаются активированными макрофагами привлеченными в место локализации опухоли интерфероном-гамма. Макрофаги могут также выделить цитотоксические вещества и иметь киллерное действие при контакте с опухолевой клеткой или через развитие реакции антителозависимой клеточной цитотоксичности, в которой специфические противоопухолевые антитела соединяют с одной стороны, опухолевую клетку, а с другой NK-клетку [15]. Таким действием обладают и натуральные киллеры, которые вызывают деструкцию опухолевой ткани без предварительной сенсibilизации, для их взаимодействия с опухолевыми клетками не нужна экспрессия антигенов HLA I класса [15].

Ответ организма на опухолевый рост обеспечивается не только клеточными иммунными реакциями, но и гуморальными факторами. При этом

взаимодействие антител с некоторыми опухолевыми клетками приводит к активации комплемента и лизису опухолевых клеток. Но хотя иммунная система разными компонентами выступает в протективную роли для предотвращения возможного развития опухолей, но едва немногие клетки, успевают скрыть своей чужеродности и избегав иммунного надзора дают начало опухоли.

Для ускользания от иммунологического надзора опухолевые клетки используют разные способы к которым, относят протективные эффекты антител по отношению к опухолям, основанные на активации супрессорных клеток и на индукции иммуносупрессии, в которой ведущую роль играют цитокины [17]. К способам ухода опухоли из-под иммунологического контроля также относят, с одной стороны, понижение плотности экспрессии на мембране молекул HLA I класса и отсутствие костимулирующих молекул CD80 и CD86, необходимых для активации Т-клеток. С другой стороны, к способам ухода от иммунного надзора относят также продукцию растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы, регулирующих иммунологические процессы. Кроме того, в опухолевых клетках вследствие генетической нестабильности возникают множественные мутации, приводящие к глубоким изменениям транскриптома клеток как за счет включения или выключения генов, так и за счет изменения уровня их экспрессии. Общим следствием этих событий являются нарушения или полная блокада способности к распознаванию опухолевых клеток клетками иммунной системы.

Следует учитывать, что развитие иммунного ответа происходит только в случае, если опухолевые клетки содержат антигены, чужеродные организму хозяина. Необходимость участия Т-лимфоцитов в противоопухолевой защите подтверждается открытием огромного числа опухолевых антигенов, вызывающих реакции иммунной системы. Что говорит о значимости оценки характера экспрессии опухолевых генов в опухолях человека [1, 46].

Опухолевые антигены являются элементами опухолевых клеток, измененными (по структуре или экспрессии) относительно здоровых клеток [4]. Они презентуются молекулами HLA I или HLA II класса на поверхности опухолевых клеток. Такие антигены могут быть презентованы только опухолевыми клетками. В таком случае они называются опухоль-специфичными антигенами (tumor-specific antigens, TSA) и, в основном, являются следствием опухоль-специфичных мутаций, например в генах p53 и Ras [85]. Более распространенными являются антигены, презентованы опухолевыми и нормальными клетками. Их называют опухоль-ассоциированными антигенами (tumor-associated antigens, TAA). Цитотоксические Т-лимфоциты, которые распознают такие антигены, могут уничтожить антиген-положительные клетки до того, как они начнут пролиферировать или метастазировать. К таким антигенам относят дифференцировочные молекулы (антигены) клеток иммунной системы, способные появляться в опухолевых клетках при злокачественной трансформации, раково-тестикулярные антигены и гиперэкспрессированные антигены. Следует заметить, что иммуногенность и антигенность опухолей определяются их содержанием опухолевых антигенов [19].

1.4 Опухолевые антигены

1.4.1 Характеристика дифференцировочных молекул клеток иммунной системы

Антигенная специфичность иммунных процессов обуславливается участием лимфоцитов, особенностью которых является присутствие на их поверхности рецепторов для распознавания антигена. Поскольку набор молекул клеточной поверхности лимфоцитов зависит не только от типа и стадии дифференцировки клеток, но и от их функционального состояния, то с помощью поверхностных антигенов можно не только различить разные лимфоциты, но и отличить покоящиеся клетки от активированных. Поверхностные антигены или,

другими словами, дифференцировочные молекулы классифицированы в соответствии с так называемыми кластерами дифференцировки (CD, от англ. Cluster of Differentiation). Поверхностные дифференцировочные молекулы клеток иммунной системы, классифицированные по системе CD, играют важную роль в активации и кооперации клеток, регуляции и реализации всех звеньев иммунного ответа [20].

Общеизвестно, что мембранные дифференцировочные молекулы могут сбрасываться с поверхности клеток и переходить в растворимую форму (S-форму, sCD, от англ. Soluble), участвуя в регуляции иммунологических процессов. Они образуются за счет протеолитического срезания с поверхности клеток мембранных гомологов, названного шеддингом или кливджем, являющимся специфическим и регулируемым событием, основанным на избирательной активации протеиназ чаще всего вследствие активационных процессов, затрагивающих различные популяции клеток [207]. Растворимая форма, образованная путем протеолитического шеддинга, лишается внутриклеточного и трансмембранного домена, но благодаря внеклеточным доменам может выполнять свои регулирующие иммунного ответа функции [12].

Вторым способом образования растворимых форм является альтернативный сплайсинг пре-мРНК, обеспечивающий кодирование одним геном структурно и функционально различающихся полипептидов. Он ведет к образованию разнообразных зрелых молекул мРНК характеризующихся соединением экзонов в разных комбинациях [108], в результате чего образуются укороченные транскрипты, соответствующие растворимым формам мембранных антигенов [11]. Растворимые дифференцировочные молекулы могут выполнять функции ограничителей или активаторов иммунных реакций, участвуя в передаче активационных сигналов, они также могут принимать активное участие в патогенетических механизмах развития различных заболеваний [26].

Выделяются несколько функциональных групп дифференцировочных молекул: ферменты (CD10, CD45), рецепторы для компонентов системы комплемента (CD35, CD46), молекулы адгезии (CD18 и CD54), молекулы смерти (CD95, CD253), рецепторы цитокинов (CD25, CD360) и рецепторы, участвующие в презентации антигена (CD1, CD83) [23]. Дифференцировочные маркеры отражают состояния адгезии, дифференцировки, активации и апоптоза.

1.4.1.1 Молекула межклеточной адгезии ICAM-1

Механические взаимодействия клеток друг с другом осуществляются молекулами межклеточной адгезии, которые занимают ключевую позицию в различных физиологических и патологических процессах, таких как эмбриогенез, гемостаз и воспаление. Белки адгезии также участвуют в механизмах хоминга клеток, что обеспечивает избирательное тканевое расселение циркулирующих в организме клеток иммунной системы. С помощью молекул адгезии осуществляется роллинг лейкоцитов по эндотелию сосудов и непосредственная миграция (диапедез) клеток иммунной системы в ткань [138]. Белки адгезии отличаются по строению и функциям и относятся к разным семействам белков. Одной из наиболее важных и хорошо изученных молекул адгезии является ICAM-1 (от англ. Inter Cellular Adhesion Molecule 1 - молекула межклеточной адгезии-1, CD54, p95 (95-kDa protein)) и принадлежащая к суперсемейству иммуноглобулинов [41]. Она представляет собой мембранный гликопротеин 1 типа и имеет молекулярную массу 85-114 кДа. Внеклеточная часть ICAM-1 включает в себя 453 аминокислоты, образующих пять иммуноглобулиноподобных доменов, связанных с одиночным трансмембранным доменом (24 а.о.). Далее следует короткий интрацеллюлярный участок (28 а.о.) (Рисунок.1) [137].

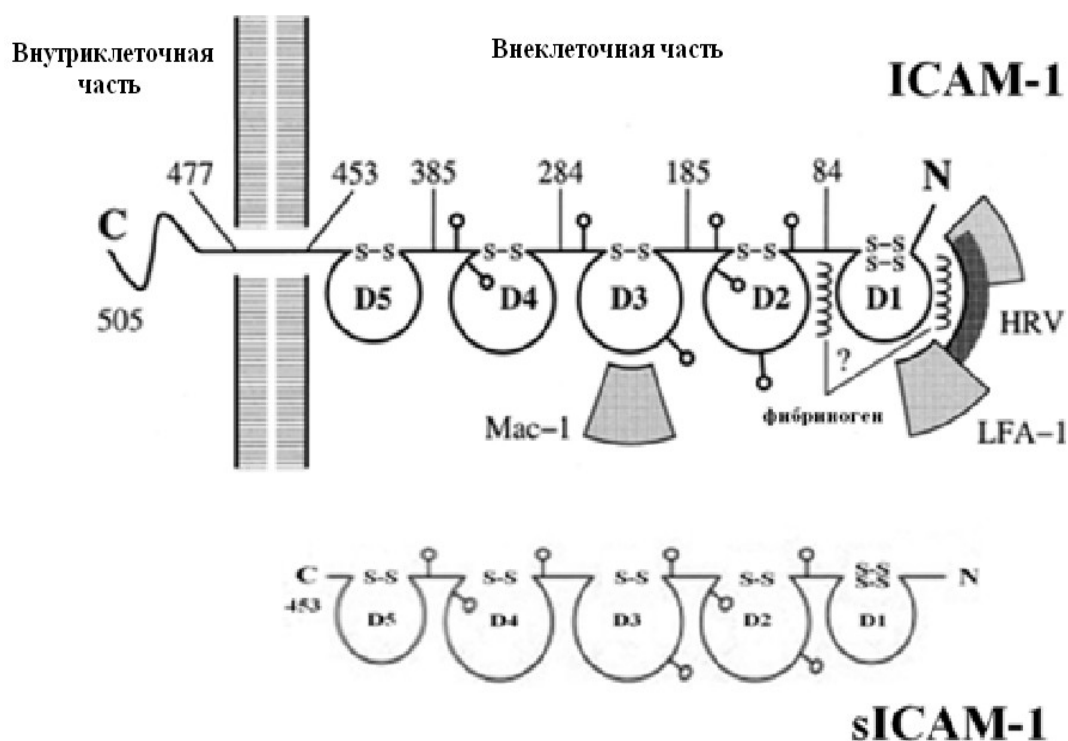


Рисунок.1 Схематическое изображение строения белка ICAM-1 (мембранной и растворимой форм) [29].

Ген молекулы ICAM-1 человека расположен на коротком плече 19 хромосомы в позиции 13-2 (19p13.2) и содержит 3249 н.о [228]. Генная последовательность ICAM-1 включает в себя 7 экзонов разделенных 6 интронами. Первый экзон кодирует сигнальную последовательность белка ICAM-1. Каждый из экзонов (2-6) кодирует один из пяти внеклеточных доменов, а экзон 7 кодирует трансмембранный домен и цитоплазматический хвост белка [241].

Молекула ICAM-1 экспрессируется на лейкоцитах, стимулированных цитокинами эндотелиальных клетках, эпителиальных клетках, синовиальных фибробластах кожи, меланоцитах, кардиомиоцитах, клетках корневой оболочки и волосяного матрикса [153], а также на некоторых других типах клеток, в том числе опухолевых [77]. Экспрессия ICAM-1 значительно увеличивается под воздействием таких цитокинов как IL-1, TNF- α , гамма-интерферон, и при воспалении [127]. ICAM-1 является лигандом для интегринов на лейкоцитах: LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18); и для фибриногена и лейкосиалина

(CD43) [221], а также служит высокоаффинным рецептором адгезии для большинства риновирусов [22].

Основной функцией ICAM-1 является обеспечение адгезии нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов к активированному сосудистому эндотелию с последующей их экстравазацией и миграцией в очаг воспаления [93]. Молекула CD54 проявляет антиапоптотический эффект. Она обеспечивает полноценную презентацию антигена и создает условия для образования иммунологического синапса между антиген-презентирующими клетками и Т-лимфоцитами, что приводит либо к активации, пролиферации и дифференцировке клетки-партнера, либо к ее гибели [87].

Мембранный белок ICAM-1, как и многие дифференцировочные мембранные молекулы клеток иммунной системы, имеет растворимую изоформу (sICAM-1/sCD54), образование которой может происходить путем шеддинга. В этом случае молекула sICAM-1 состоит из пяти внеклеточных доменов. Растворимая молекула ICAM-1 может образовываться и путем альтернативного сплайсинга [14]. Для ICAM-1 известны 5 альтернативных видов мРНК. Их экспрессия и экспрессия кодируемых ими белков тканеспецифична [129]. Одна из форм растворимого антигена является доминирующей – форма без трансмембранного домена (CD54TMDel) [70]. Образование растворимого белка CD54 индуцируется при развитии активационных процессов и при длительном контакте ICAM-1 со своими лигандами, особенно с MAC-1 [45].

При обострении различных заболеваний уровень sICAM-1 повышается. Изменения в содержании сывороточного растворимого CD54 являются одним из звеньев каскада иммунологических реакций в ответ на термическую травму [3]. Для многих типов клеток экспрессия ICAM-1 служит маркером активации и может быть индуцирована тканеспецифическими стимуляторами (IL-2 на Т-клетках; IL-2, IL-4 на В-клетках) [93].

1.4.1.2 Альфа-цепь рецептора интерлейкина-2

Клетки иммунной системы взаимодействуют между собой не только за счет непосредственных межклеточных контактов, но и путем секреции огромного количества белковых регуляторных факторов, названных лимфокинами - это цитокины, выделяемые лимфоцитами. Самым ранним и базовым лимфокином в процессе развития и усиления иммунного ответа, является интерлейкин-2 (IL-2). Он представляет собой цитокин, взаимодействующий в первую очередь с Т-клетками, В-клетками и естественными киллерами. Биологическая функция IL-2 заключается в стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов и обеспечении их дифференцировки [98]. Параллельно он стимулирует В-лимфоциты, натуральные киллеры и фагоциты. Также установлено, что IL-2 стимулирует синтез и секрецию целого ряда других лимфокинов [156]. Интерлейкин 2 действует на Т- и В-лимфоциты, связываясь со своим специфическим рецептором IL-2R [67]. Рецептор IL-2 это гетеротримерная молекула, состоящая из трех различных субъединиц: альфа-цепь (IL-2R α , CD25), бета-цепь (IL-2R β , CD122), и гамма-цепь (IL-2R γ , CD132) (Рисунок.2). Наибольшим сродством к IL-2 обладает комплекс из всех трёх субъединиц, хотя связывать этот лиганд с низкой аффинностью может как α субъединица (CD25), так и комплекс из β и γ единиц (Рисунок.2). Однако при присоединении α субъединицы к β и γ единицам аффинность связывания комплекса с IL-2 резко возрастает [233].

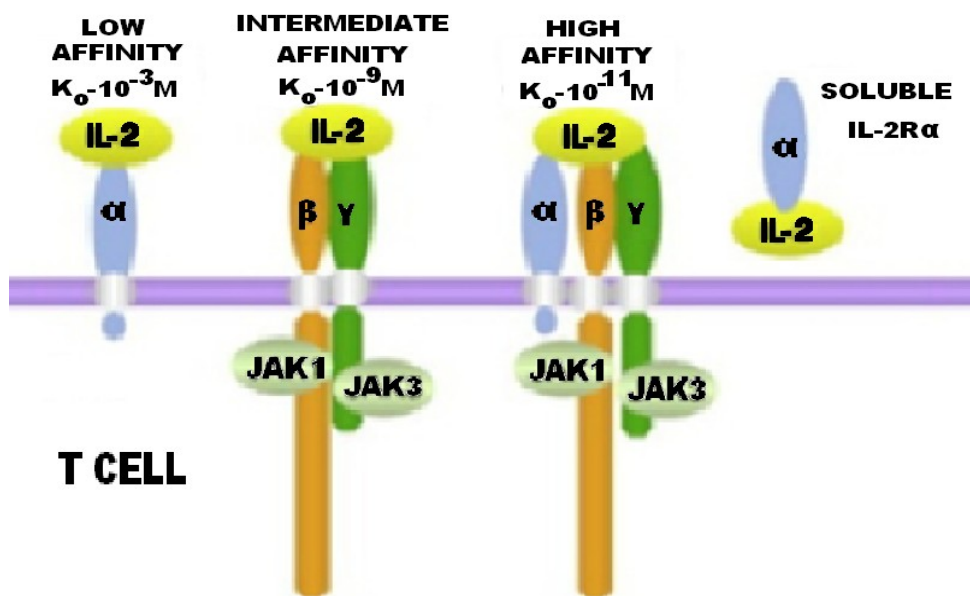


Рисунок. 2. Рецепторы IL-2, обладающие высоким, средним и низким сродством связывания с лигандом [233].

Молекула CD25 - α -цепь рецептора IL-2 (IL-2R α /IL-2RA/Tac антиген (T activation cell)/ белок p55/ TCGFR антиген (T cell growth factor receptor – рецептор фактора роста Т-клеток)). Это трансмембранный гликопротеин I типа. (55 кДа) содержащий 272 а.о., кодируемых геном, локализованным в р14-15-регионе 10 хромосомы [193].

Ген, кодирующий CD25, состоит из восьми экзонов. Первый экзон кодирует сигнальную последовательность белка (21 а.о.), экстрацеллюлярная область (219 а.о.) закодирована в экзонах со второго по шестой, трансмембранная область, содержащая 19 а.о., кодируется нуклеотидной последовательностью седьмого экзона, а 13 аминокислот, составляющих цитоплазматический хвост, кодируются в 8 экзоне [140, 230]. В нормальных покоящихся Т- и В-лимфоцитах транскрипции этого гена не происходит. Но когда клетки активируются и начинают делиться, IL-2R α быстро появляется на мембране активированных В- и Т-лимфоцитов и на моноцитах. Эта особенность молекулы CD25 делает ее уникальным маркером активации иммунной системы

до появления других маркеров активации и задолго до пролиферации лимфоцитов.

Дифференцировочная молекула CD25 обнаружена на макрофагах, натуральных киллерных клетках, эозинофилах, и на клетках солидных опухолей [23]. Клиническая значимость экспрессии CD25 молекулы показана при ряде заболеваний, включая онкологических и аутоиммунных заболеваниях [36, 196].

На поверхности Т-клеток, помимо полноразмерной формы IL-2R α белка, детектируются ещё другие укороченные мембранные формы CD25, кодируемые альтернативными формами мРНК IL-2R α в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК [60]. Две из этих форм мРНК - форма с делецией 4 экзона (CD25Exo4Del), и форма с делецией экзонов 4 и 5 (CD25Exo4-5Del). Было показано, что отсутствие 5 экзона не меняет способность продукта трансляции к связыванию лиганда [174, 163], а отсутствие 4 экзона наоборот препятствует связыванию IL-2 [109, 60]. Альтернативная форма мРНК CD25 (CD25Exo4Del) была обнаружена в Т- и В-клетках, инфицированных вирусом HTLV-I, в Тас-позитивных Т-клетках периферической крови, активированных фитогемагглютинином, и в Тас-негативных Т-клетках больных острой лимфоцитарной лейкемией, активированных фоболмиристатацетатом [139, 60]. Форма мРНК IL-2R α (CD25Exo4-5Del) была обнаружена в опухолевых клетках линии Т-клеточной лимфомы [163]. Показано, что профиль экспрессии альтернативных форм мРНК IL-2R α коррелирует со степенью активации клеток иммунной системы [203].

При активации клеток экспрессия IL-2R меняется не только путем появления экспрессии мембранного IL-2R α на клетке, но и путем высвобождения, за счет шеддинга, отщепленной экстарцеллюлярной области α -субъединицы во внеклеточное пространство и её превращение в растворимый рецептор IL-2 (sIL-2R, sCD25) - циркулирующий маркер клеточной активации. Он вырабатывается активированными Т-лимфоцитами, трансформированными

Т- и В-клетками, лейкоэмическими клетками, лимфоцитарными активированными киллер-клетками и натуральными киллерами. При этом секретируемая форма по молекулярной массе на 10 кДа меньше, чем мембранный белок, но сохраняет способность связывать IL-2 и вызывает антигенную неспецифическую пролиферацию всех популяций Т-лимфоцитов и является фактором роста всех киллерных клеток, поэтому играет большую роль в регуляции клеточного иммунитета, в том числе противоопухолевого и трансплантационного иммунитета. С другой стороны, обнаружено, что растворимый CD25 может взаимодействовать с другими растворимыми цепями рецептора и образовывать комплекс, подобный мембраносвязанному рецептору IL-2 [72]. Растворимый и мембрано-связанный рецептор IL-2 могут связываться, что ведет к угнетению IL-2-индуцированной активации мононуклеарных клеток крови [12].

Показано, что sIL-2R присутствует *in vivo* в низких концентрациях в сыворотке крови здоровых людей, и его уровень сильно повышен при различных патологических состояниях, подобных опухолевому росту [100]. Изменение сывороточного уровня sCD25 наблюдается при различных заболеваниях, сопровождающихся активацией иммунной системы. Сывороточное содержание sCD25 служит показателем активности различных онкологических заболеваний: меланомы, рака желудка, рака легких и других онкологических заболеваний [172, 229]. Практически во всех случаях уровень sCD25 коррелирует с прогрессией заболевания, метастазами в лимфоузлы и результатом противоопухолевой терапии [100]. Успешная терапия обычно сопровождается существенным падением сывороточного уровня растворимых молекул CD25 [66].

1.4.1.3 Иницирующая апоптоз молекула Fas

Одним из фундаментальных механизмов регуляции иммунных реакций является апоптотическая гибель иммунокомпетентных клеток, необходимая для

установления баланса между их эффективным функционированием, и их своевременным и безопасным удалением [18]. Апоптоз необходим также для удаления поврежденных, инфицированных и злокачественно-трансформированных клеток [6]. Он может быть инициирован внутренним путем, требующим непосредственного участия митохондрий [101], либо внешним путем, реализуемым при участии рецепторов смерти и их лигандов. Одним из этих рецепторов является молекула Fas (от англ. Fragment Apoptosis Stimulating) [161].

Молекула Fas или CD95 (Apo-1 (Apoptosis antigen 1)/TNFRSF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 6)) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа с молекулярной массой 45-52 кДа [69]. Белок CD95 относится к семейству рецептора фактора некроза опухоли и состоит из внеклеточной области, включающей сигнальный пептид и трех доменов (157 а.о.), 17 трансмембранных аминокислот и цитоплазматического региона (145 а.о., среди которых приблизительно 70-80 аминокислот образуют домен смерти DD: Death Domain) (Рисунок.3). В функциональном отношении молекула Fas представляет собой биполярную молекулу, внеклеточный участок которой необходим для взаимодействия с Fas лигандом (FasL/CD178), а внутрицитоплазматический участок абсолютно необходим и достаточен для трансдукции цитотоксического сигнала [120].

Инициация Fas-опосредованного (Fas-зависимого) пути апоптоза осуществляется гомотримерной формой молекулы CD95 [69]. После связывания Fas-лиганда активированный рецептор образует гексамер (парный тример Fas/FasL) и взаимодействует с адаптером FADD (Fas-associated death domain), который вступает во взаимодействие с прокаспазами-8 и 10. После этого каспаза-8 активирует эффекторные протеолитические ферменты - каспазы-3, 6, и 7, выполняющие апоптотические функции [130].

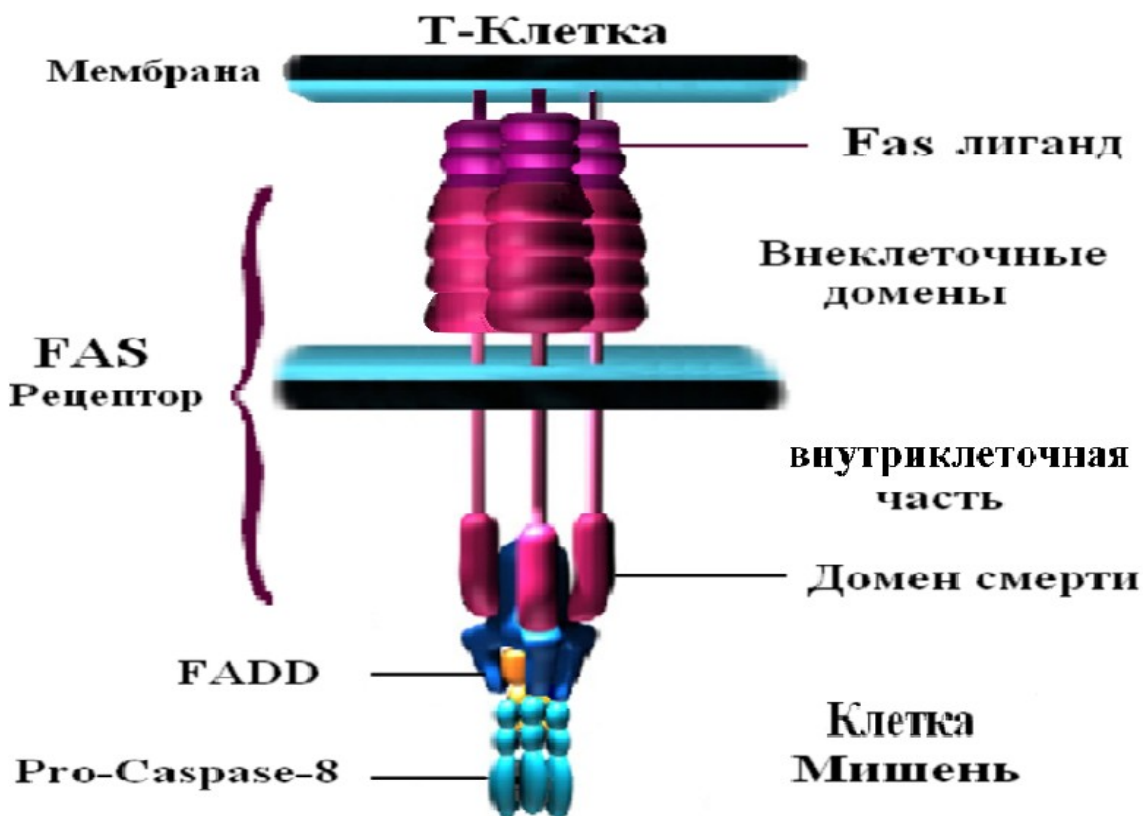


Рисунок. 3. Тримерная структура мембранной формы молекулы Fas

Ген APT, кодирующий CD95 протеин у человека, локализован в длинном плече десятой хромосомы (10q23) и имеет протяженность 25 255 оснований, организованных в 9 экзонов [143]. Внеклеточная часть белка закодирована в 1-5 экзонах, трансмембранный домен - в экзоне 6, в 7-9 экзонах кодируется внутриклеточная часть, содержащая домен смерти [182]. Экспрессия гена APT усиливается под действием IFN- γ , TNF и при активации лимфоцитов [143].

Молекула Fas экспрессируется на мембране самых разнообразных клеток, предрасположенных к пролиферации и/или апоптозу, таких как кортикальные тимоциты, активированные Т- и В-лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и в меньшей степени эозинофилы. Вне иммунной системы молекула Fas экспрессируется на фибробластах, гепатоцитах, кератиноцитах, клетках нервной системы и других [182; 143]. Белок Fas играет важную роль в патогенезе многих заболеваний, характеризующихся либо слишком активным либо слишком

слабым апоптозом клеток, таких как СПИД или онкологические заболевания [186].

Особенностью экспрессии гена АРТ (Fas) является высокое разнообразие форм мРНК, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Среди них выделяют мембранные (mFas) и растворимые (sFas, sCD95) [43]. Обнаружено 7 альтернативных вариантов мРНК, кодирующих мембранные формы Fas протеина и 15 форм, кодирующих растворимый белок. Среди растворимых изоформ выделяют доминирующую форму Fas белка, лишенную трансмембранного участка, образующуюся за счет делеции интактного 6 экзона с сохранением рамки считывания и продуцирующуюся в межклеточное пространство (FasTMDel/FasExo6Del). Образование растворимой формы Fas протеина может происходить и за счет шеддинга [16]. Экспрессия мРНК FasExo6Del обнаружена в клеточных линиях рака мочевого пузыря, в опухолевых очагах аденокарциномы желудка, при острой лейкемии и при многих других онкологических заболеваниях [119, 154].

Изменения в содержании растворимых молекул Fas отмечены при таких заболеваниях, как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, при системной красной волчанке [248]. У онкологических больных описано повышение содержания растворимых молекул Fas в сыворотке крови при гепатоцеллюлярном раке печени, раке желудка, саркомах костей, раке молочной железы, лимфомах и других онкологических заболеваний [198, 180].

1.4.2 Характеристика основных групп раково-тестикулярных антигенов

Раково-тестикулярные антигены - это группа опухоль-ассоциированных антигенов, экспрессия которых в норме обычно наблюдается только в семенниках, плаценте, трофобласте и яичниках. Но их экспрессия часто обнаруживается в большинстве первичных и метастатических опухолей [217]. Исследование раково-тестикулярных генов началось с открытия гена MAGE-A, обнаруженного в 1991 Van der Bruggen и коллегами у больных меланомой [223].

С тех пор число гомологов MAGE возросло, вследствие чего возникла необходимость стандартизовать их классификацию. С этой целью Scanlan и коллегами в 2004 году была создана единая номенклатура, согласно которой группы генов, обладающих схожим профилем экспрессии, ограниченным зародышевыми клетками и клетками опухолей, получили названия СТ генов (от англ. Cancer/testis) [205]. СТ номенклатура, представляет собой хронологически выстроенный список, в котором порядковый номер гена в основном характеризует порядок его идентификации. К данному моменту описано свыше 240 представителей и более 80 семейств, некоторые из которых имеют несколько членов, такие как семейство MAGEA, GAGE и XAGE-1 [171, 244].

Существуют две группы СТ генов. Первая включает гены I класса локализованы на X-хромосоме «X-ассоциированные раково-тестикулярные гены» и образуют мультигенные семейства, такие как MAGE, XAGE, GAGE и т.п. [209]. Их экспрессия в зародышевых клетках наблюдается преимущественно на ранних стадиях эмбриогенеза, а в соматических клетках экспрессируются только при их злокачественном перерождении [168]. В отличие от них, гены II класса локализуются в аутосомах в виде отдельных генных представителей. «X-независимые СТ гены» экспрессируются различно в человеческих тканях в норме и при патологии [167]. Их экспрессия в зародышевых клетках ассоциирована с поздними стадиями дифференцировки клеток [168].

В соматических клетках экспрессия СТ генов может быть подавлена метилированием или деацетилизацией. При малигнизации регуляция работы СТ генов нарушается, в результате чего в опухолях разных типов наблюдается их экспрессия. Они чаще экспрессируются группами, по несколько генов в клетках одной опухоли [118]. СТ гены экспрессируются в результате включения гаметогенной программы при гипометилировании CpG-регионов ДНК и ацетилизировании гистонов [194, 217]. Экспрессия этих генов в опухолевых клетках индуцируется деметилированием их промоторов [215]. Считается, что

экспрессия этих генов может быть связана с приобретением опухолевыми клетками таких свойств, как immortalization, неограниченная пролиферация, способность к миграции и к уклонению от иммунного надзора. [199].

Функции продуктов СТ генов в эмбриональных тканях и в опухолевых клетках остаются малоизученными. Хотя группа СТ генов активно исследуется с мониторинговыми и терапевтическими целями [114, 38], тем не менее, функции, известны только для нескольких генов. В целом охарактеризованные функции, выполняемые раково-тестикулярными белками, организуются в разных группах (Таблица. 1).

Экспрессия раково-тестикулярных генов в зародышевых клетках наблюдается преимущественно на ранних стадиях эмбриогенеза и гаметогенеза [168]. Для нескольких СТ генов, таких как NY-ESO1, MAGEA, GAGE, RAGE и SSX, экспрессия мРНК была продемонстрирована в мезенхимальных стволовых клетках [61].

Таблица 1 - Функции раково-тестикулярных белков

Функции	Раково-тестикулярные белки
Регуляция транскрипции	MAGEA, BORIS, HOM-TES-85, NECDIN, CAGE [136, 158].
Участие в передаче сигнала	LIP1, SGY1, MAGE, SPAG9 [110, 136]
Хеликаза-подобное действие	CAGE, HAGE [52,157]
Межклеточная адгезия и взаимодействия с матриксом	SPA17, TPX1, ADAM2, CT45 [31, 205]
Ферментативная активность	ADAM2, LIP1, LDHC [205, 211]
Модуляция апоптоза	GAGE, MAGE-A, NECDIN [135]
Структурные компоненты	SCP1, SPO11, SYCP1 [99]
Клеточная локомоция	SSX, CAGE, SEMG1, CT45 [31, 128]
Регуляция суточных ритмов	MAGED1/NRAGE, MAGEL1 [68, 232]

Различные типы опухолей, такие как гемопоэтические опухоли, (лимфомы и лейкозы), а также рак почки и рак поджелудочной железы показывают низкую частоту экспрессии СТ генов [76, 175]. Напротив, другие типы опухолей, такие как меланома, рак яичников, рак легких показывают очень высокую частоту экспрессии СТ генов [38, 216]. Высокая степень злокачественности опухоли и наличие метастазов ассоциируют с более высокой частотой экспрессии СТ генов в сравнении с первичными опухолями [133]. Примером согласованной экспрессии нескольких СТ генов в одной опухоли может быть рак легких [28]. С другой стороны некоторые опухоли демонстрируют отсутствие экспрессии СТ генов [175].

Раково-тестикулярные антигены являются иммунодоминантными белками, на них активно отвечает иммунная система. У онкологических больных различные СТ белки или их отдельные эпитопы могут распознаваться цитотоксическими и/или хелперными Т-лимфоцитами и индуцировать клеточный и/или гуморальный иммунный ответ [202], что указывает на их потенциальную пригодность для противоопухолевой терапии [81, 38].

1.4.2.1 Суперсемейство MAGE генов

Первым обнаруженным представителем этого суперсемейства генов явился ген MAGE-1, который был переименован в MAGE-A1 (от англ. Melanoma AntiGene – антиген, ассоциированный с меланомой) [223]. На данный момент идентифицированы семейства MAGE от -A до -L и Necdin [34]. Каждое семейство представляет собой кластер, занимающий определённый регион X хромосомы или аутосомы [63]. Белки, кодируемые MAGE генами, содержат консервативную последовательность, около 200 аминокислот в длину, называемую MAGE гомологичный домен (MHD) [34].

Первый кластер MAGE-A генов был описан в регионе Xq28 [63]. Немного позже были обнаружены ещё два кластера гомологичных генов в регионе Xp21 (MAGE-B) [170] и Xq26–27 (MAGE-C) [151]. Гены, принадлежащие семействам

MAGE -A, -B и -C, классифицируются как гены MAGE I типа. Они характеризуются присутствием полной открытой рамки считывания (ОРС), закодированной в терминальном экзоне. Более того, они все имеют ограниченный профиль экспрессии в опухолях и семенниках за исключением нескольких псевдогенов, например MAGE-A7 [53].

Изучение MAGE генов выявило исключительность нескольких представителей суперсемейства по нуклеотидной последовательности и профилям экспрессии, что позволило объединить их в отдельную группу – MAGE II типа. Эта группа включает гены, имеющие разделенную на несколько экзонов ОРС и гетерогенный профиль экспрессии [152]. Среди них, гены семейств MAGE-D, E, F, G, H, магфинины и трофинин, характеризующиеся различным уровнем экспрессии в нормальных тканях [53].

Семейство MAGE-A или CT1 включает 12 генов (MAGE-A1 - MAGE-A12). Члены этого семейства кодируют белки с 50-80%-ной идентичностью последовательностей. Промоторы и первые экзоны MAGE-A показывают значительную вариабельность, что свидетельствует о различиях в регуляции их транскрипции [53]. Выравнивание последовательности MAGE-A2, -A3, -A4 и -A12 показало их почти полную идентичность. Белки MAGE-A состоят из 309-319 аминокислот. MAGE-A2-6 и 8-12 на 57% -77% идентичны MAGE-A1 [63].

MAGE-A(1-6) экспрессируются в большинстве опухолей различных гистологических типов [53]. Часто наблюдается одновременная экспрессия нескольких генов MAGE-A, что можно использовать для диагностики и прогноза течения онкологических заболеваний [134]. Белок MAGE-A6 содержит последовательности, соответствующие эпитопам, презентруемым молекулами HLA-DR, что индуцирует иммунный ответ у больных раком почки [220].

Семейство MAGE-C включает 3 гена: MAGE-C1/CT7.1, MAGE-C2/CT10, MAGE-C3/CT7.2. Они все локализованы на X-хромосоме (Xq26-q27) [151]. Типичным представителем семейства MAGE-C является ген MAGE-C1, который состоит из 4 экзонов и кодирует белок из 1142 а.о. [50]. Анализ

последовательности кДНК и белка MAGE-C1 показал сильную гомологию с генами семейства MAGE-A, в частности MAGE-A10 [63]. Уникальной особенностью MAGE-C1, отличающей его от других MAGE генов, является присутствие области из 867 а.о. на N-конце, состоящей из многих tandemных повторов, богатых остатками серина, пролина, глутамина, и лейцина [50]. Гиперэкспрессия MAGE-C1 наблюдается при множественной миеломе и раке яичников [247, 81]. Также обнаружена корреляция между экспрессией гена MAGE-C1 и экспрессией генов NY-ESO-1 и SPA17 [189].

1.4.2.2 Суперсемейство генов GAGE/PAGE/XAGE

После открытия суперсемейства MAGE генов исследователи продолжали поиск опухолевых антигенов, подходящих для диагностики и терапии злокачественных новообразований. В 1995 году был открыт СТ антиген GAGE-1, который явился первым представителем нового суперсемейства GAGE/PAGE/XAGE. Впоследствии было показано, что суперсемейство включает не менее 21 гена, состоит из 3 семейств – GAGE, XAGE и PAGE. Хотя большинство генов суперсемейства сохраняют экзон-интрон структуру, аналогичную GAGE генам, тем не менее они очень сильно различаются. Выравнивание мРНК GAGE, PAGE и XAGE показывает их общее происхождение. Однако мРНК GAGE идентичны только на 65% мРНК XAGE и на 55% генам PAGE [91].

Семейство генов GAGE: GAGE гены (от англ. G melanoma associated gene) имеют высокую идентичность, равномерное распределение tandemных повторов и отличаются друг от друга единичными нуклеотидными заменами [149, 184]. Гены GAGE локализованы в p11.2-p11.4 регионе X-хромосомы и состоят из 5 экзонов, особенностью которых является наличие в 4-х из них длинной ORC, кодирующей небольшие белки, имеющие высокую степень гомологии [62].

Продукты трансляции GAGE генов позволяют их разделить на две группы, первая из которых содержит гены GAGE-1, -2 и -8 кодирующие во втором экзоне

первый идентифицированный антигенный пептид из 117 а.о., презентуемый HLA-Cw6 молекулами и распознаваемый цитотоксическими Т-клетками человека. Пептид содержит потенциальные сайты фосфорилирования киназой II и протеин-киназой С [47]. Вторая группа GAGE генов включает гены GAGE-3, -4, -5, -6, и -7, кодирующие во втором экзоне другой антигенный пептид, презентуемый молекулами HLA-A29, и тоже распознаваемый цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Экспрессия GAGE генов наблюдается в норме в герминальных клетках гонад и неподнадзорных иммунной системе органах (цитотрофобласт, сетчатка глаза). При онкопатологии их экспрессия обнаружена в различных видах первичных и метастазирующих опухолей [91, 51]. Экспрессия GAGE генов коррелирует с плохим прогнозом и индуцируется *in vitro* деметилирующим агентом 5-aza-2-deoxycytidine. В опухолях она является результатом процесса деметилирования и вызывает иммунный ответ [62].

Семейство XAGE генов: Поиск GAGE-подобных генов привёл к открытию нового семейства XAGE, содержащего не менее 14 СТ генов, расположенных в p11.21-p11.22 СТ-богатом регионе X хромосомы в виде трех кластеров (XAGE-1, -2 и -3). Гены XAGE (от англ. X associated gene) или СТ12 содержат 4-5 экзонов и первичную ОРС, начинающуюся в начале второго экзона. Особенный интерес представляет ген XAGE-1, состоящий из 4 экзонов, последовательность кДНК которых содержит 611 н.о., включая 438 нуклеотидов в кодирующей области. XAGE-1 отличается от других представителей его суперсемейства наличием 2 ОРС, первая кодирует белок (146 а.о. 16 кДа), содержащий потенциальный трансмембранный домен, а вторая ОРС кодирует белок, лишённый трансмембранного участка и гомологичный белкам GAGE по С-концу [148]. Другое отличие гена XAGE-1 - это присутствие двух сайтов инициации транскрипции и двух участков поли-А [74].

XAGE-1 представлен 4 изоформами - XAGE-1a, -1b, -1c и -1d, образующимися в результате альтернативного сплайсинга и кодирующими белки 146 а.о., 81 а.о., 60 а.о. и 69 а.о. соответственно. XAGE-1c содержит вставку из 220 н.о. первого интрона, составляющих дополнительный экзон 1', а XAGE-1d содержит вставку из 16 н.о. между экзонами 2 и 3, составляющих дополнительный экзон 2' [244]. Предполагается, что XAGE-1b является доминирующим транскриптом XAGE-1 гена. Более того, продемонстрирована иммуногенность XAGE-1b и корреляция экспрессии XAGE-1b и XAGE-1d у больных аденокарциномой легких [102]. Изучение генов XAGE позволило идентифицировать несколько эпитопов, способных вызвать цитотоксический иммунный ответ [188]. Антитела против XAGE-1b, -1c, -1d были выявлены у онкологических больных [202]. XAGE-1a и XAGE-1d показывают диагностическую эффективность, сравнимую с СЕА (карциноэмбриональный антиген) и являются потенциальными биомаркерами рака легких [116].

Семейство PAGE генов (от англ. Prostate Associated Gene – ген ассоциированный с простатой) или CT16. Впервые описаны в 1998 году двумя независимыми группами ученых [39; 47]. PAGE гены являются X-ассоциированными генами, локализованными в p11.21-23 регионе и включающими 5 экзонов, которые не кодирует антигенные пептиды. Гены PAGE имеют 45%-ную гомологию с генами GAGE [103]. Наиболее близкий член семейства GAGE к PAGE генам – это ген GAGE-2. Сейчас в семействе PAGE насчитывается 7 генов, мало отличающихся друг от друга [42].

Ген PAGE-1 (переименован в GAGE-9) кодирует пептид из 143 а.о., имеющий молекулярную массу 16 кД. В последовательности PAGE-1 существуют два участка, которые содержат Arg-Gly-Asp (RGD) домены, окруженные последовательностью, аналогичной RGD мотивам, характерной для белков клеточной адгезии [39]. Высказано предположение, об их вовлеченности в межклеточные взаимодействия [181].

1.4.2.3 Семейство генов HAGE

Представитель этого семейства классифицирован как CT13 и назван аббревиатурой HAGE (от англ. Helical AntiGene: антиген, обладающий хеликаза-подобным действием). Он был идентифицирован первоначально в 2000 году в клеточной линии рабдомиосаркомы [157]. HAGE антиген также называется DDX43 (от англ. DEAD box polypeptide 43), кодируется X-независимым геном, локализованным в q12-13-регионе 6 хромосомы, и способен давать три транскрипта [89]. Ген построен из 2365 п.н.о, образующих 17 экзонов, имеет длинную ОРС (1944 п.н.о), кодирующую белок из 648 аминокислот (73 кДа) - DDX43. Он принадлежит к DEAD box семейству АТФ-зависимых РНК хеликаз, которые характеризуются наличием девяти консервативных мотивов. Анализ последовательности белка HAGE показал, что он имеет DEAD box домены, типичные для семейства АТФ зависимых РНК хеликаз, в том числе D-E-A-D мотив (Asp-Glu-Ala-Asp). Белок DDX43 содержит эпитопы, связывающие с молекулами HLA-A2 и HLA-DR, которые способны индуцировать пептид-специфическую и HLA-зависимую пролиферацию CD4+Т-клеток. Эти пептиды иммуногенны и подвергаются эндогенному процессингу Т-клетками [160]. РНК хеликазы, и в том числе HAGE/DDX43, участвуют в сперматогенезе, эмбриогенезе, и во многих различных этапах метаболизма РНК, включая транскрипцию, сплайсинг пре-мРНК, биогенез рибосом, трансляцию и деструкцию мРНК [59]. Участие данных РНК хеликаз в развитии рака было зарегистрировано несколькими работами [235, 239].

Гипометилирование промотора DDX43 является ранним и частым молекулярным событием в развитии острой миелоидной лейкемии [48]. Предложено рассмотреть HAGE в качестве мишени для терапии, а также использовать его в качестве биомаркера при раке молочной железы [145].

1.4.2.4 Семейство CTAG генов

Семейство CTAG (от англ. Cancer Testis Antigen Genes) также называемое NY-ESO (LAGE, ESO), представлено 3 генами - ESO1 (NY-ESO-1, LAGE-2), ESO2 (NY-ESO-2, LAGE-1) и ESO3 (LAGE-3). Они классифицированы как CT6, и локализованы на Xq28 хромосоме [141]. NY-ESO-1 (от англ. New York esophageal squamous cell carcinoma) был первым геном этого семейства, идентифицированным у больных раком пищевода [49]. Он состоит из 3 экзонов и 2 интронов. В ходе альтернативного сплайсинга образуются транскрипты, кодирующие полипептиды длиной 180, 210 и 109 а.о. Три полипептида NY-ESO-1 содержат несколько предполагаемых сайтов фосфорилирования для киназы II [222]. Также показано наличие сайтов связывания транскрипционных факторов Sp1 и Ets. Более того установлено, что при раке лёгких фактор Sp1 взаимодействует с BORIS, регулируя работу гена NY-ESO-1 [122].

Другой особенностью продуктов NY-ESO-1 и NY-ESO-2 генов является их сильная иммуногенность у пациентов с опухолями, экспрессирующими эти гены. Показано, что 40-50% пациентов с прогрессирующими NY-ESO-1-положительными опухолями имеют гуморальный и/или Т-клеточный ответ на NY-ESO-1 [117]. Среди всех CT антигенов NY-ESO-1, а также NY-ESO-2 имеют самое большое количество идентифицированных аллельных вариантов молекул HLA I и II классов, связывающих пептиды, распознаваемые CD8⁺ и CD4⁺Т-клетками у онкологических больных [73, 86].

Антитела против NY-ESO-1 были выявлены у 25-50% пациентов при раке молочной железы, мочевого пузыря, яичников, меланоме и легких [79, 113]. Продукты гена NY-ESO-1 использованы при создании и клинических испытаниях дендритных вакцин для борьбы с злокачественными новообразованиями [96].

1.4.2.5 Семейство генов CSAGE

Семейство CSAGE/TRAG содержит, по крайней мере, два члена: TRAG-3 и CSAGE. Последний имеет не менее трех сплайсинговых вариантов мРНК: CSAGE-a, -b и -c [144]. TRAG-3 (от англ. Taxol Resistance-Associated Gene-3: ген, ассоциированный с резистентностью к таксолу), известен также как CSAG2 (chondro Sarcoma Associated Gene 2), был классифицирован как CT24.2 (cancer/testis antigen family 24, member 2) и является СТ геном, обнаруженным при сравнении яичниковых клеточных линий SKOV-3 и SKOV-3TR в поиске новых генов, ответственных за резистентность к таксолу [71].

Ген TRAG-3 локализован на хромосоме Xq28 внутри комплекса генов, кодирующих антигены меланомы (MAGE), и состоит из двух экзонов [82]. Нуклеотидная последовательность TRAG-3 (796 п.н.о.) имеет ОРС (333 п.н.о.), закодированную целиком в первом экзоне. В результате альтернативного сплайсинга гена TRAG-3 образуется не менее четырех вариантов мРНК: TRAG-3, TRAG-3L, TRAG-3CS и TRAG-3Lcs и три белковых продукта из 127, 110 и 48 аминокислот [144]. Первые два белка содержат эпитопы, презентруемые молекулами HLA-DR и HLA-A2, и способны индуцировать клеточный, но не гуморальный иммунный ответ у онкологических больных, экспрессирующих TRAG-3 [111, 144]. Локализация и сопоставимый характер экспрессии генов TRAG-3 и MAGE предполагает, что TRAG-3 может быть членом семейства MAGE. Тем не менее, промотор TRAG-3 не имеет гомологии с промоторами генов семейства MAGE [64].

Установлено, что экспрессия TRAG-3 в SKOV-3 клетках индуцирована таксолом и связана с резистентностью к нему, хотя трансфекция и экспрессия TRAG-3 в нерезистентных к таксолу клетках линии SKOV-3 не вызывает резистентности [71]. Показано наличие спонтанного клеточного иммунного ответа на TRAG-3 антиген у больных раком, что позволяет рассматривать его не только как маркер опухолевого процесса, но и как мишень в иммунотерапии при различных онкологических заболеваниях [111].

1.4.2.6 Семейство генов RAGE

Семейство генов RAGE было идентифицировано с использованием генетического подхода, основанного на трансфекции клеточных линий почек COS-7 с помощью кДНК, полученных от клеток почечной карциномы. Gaugler с коллегами в 1996 году выявили первый иммуногенный антиген этой группы, распознаваемый аутологичными цитотоксическими Т-лимфоцитами при раке почки человека - RAGE-1 (от англ. Renal AntiGE_n: почечный антиген) [88]. Антиген RAGE-1 кодируется геном, локализованным в 14q32 регионе 14 хромосомы и состоящим из 12 экзонов. Последовательность RAGE-1 (1118 п.н.о.) содержит 5 ОРС (Рисунок.4). Первая ОРС (позиции 173 - 271), вероятно, нетранслируемая, её инициаторный кодон AUG не окружен консенсусной последовательностью, необходимой для эффективной инициации трансляции [131]. Вторая ОРС (позиции 204 - 326) - это 123 п.н.о., кодирующих предполагаемый мембранный белок из 40 аминокислот с молекулярной массой 11.3 кДа, и имеющий Т-клеточный эпитоп, презентируемый молекулами HLA-B7 (decameric пептид SPSSNRIRNT (RAGE-1₂₀₄) [88, 176]. Пептид RAGE-1₂₀₄ эффективно сенсибилизирует HLA-B7+ Эпштейна-Барр+ В-клетки к лизису цитотоксическими Т-клетками [88]. Кроме того показано что, HLA-B7+ RAGE1-отрицательные клетки рака почки не распознаются такими цитотоксическими клетками [175].

В 1998 году идентифицирован и изолирован из почечной клеточной линии A498 другой опухоль-ассоциированный RAGE-пептид, распознаваемый цитотоксическими Т-клетками и связывающийся с молекулами HLA-B8 (decameric пептид PASKKTD_PQK (RAGE-1₄₄₄)). Пептид может быть использован для стимуляции цитотоксического иммунитета против рака почки путем иммунизации *in vitro* [84].

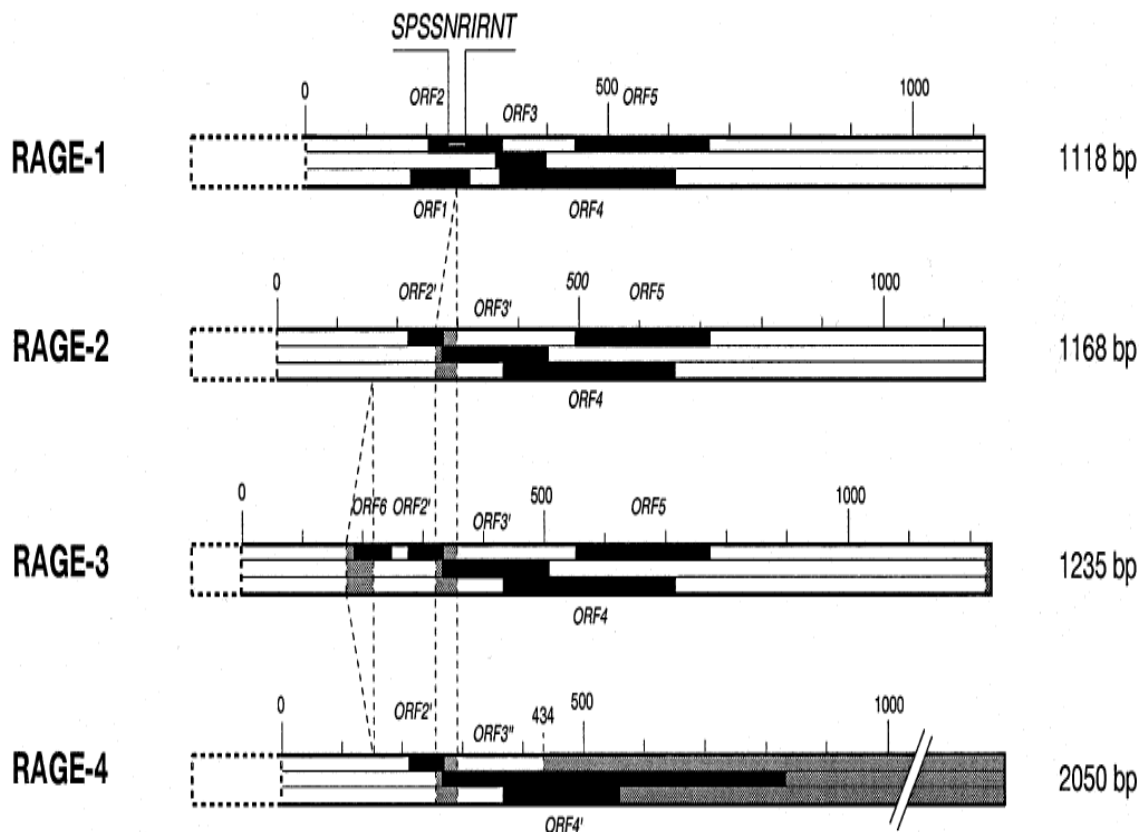


Рисунок.4. Схематическое изображение кДНК RAGE-1, 2, 3, и 4

Позже, в работе Eichmüller и коллег, было отмечено существование других видов мРНК, связанных с RAGE геном. По сути дела мРНК RAGE состоит из нескольких подтипов (RAGE-1,-2,-3,-4), которые могут быть вариантами сплайсинга одного и того же гена. Все три новые последовательности кДНК RAGE-2, -3 и -4 имеют вставку из 37 п.н.о. которая приводит не только к сдвигу рамки считывания OPC2 в RAGE-2, -3 и -4 по сравнению с RAGE-1, но и к отсутствию продукта RAGE-1₂₀₄. (Рисунок.4) [75].

Существует предположение, что в эволюционном плане ген RAGE привел к возникновению гена МОК, кодирующего полипептидную цепь (419 а.о) МОК протеинкиназы, принадлежащей к суперсемейству митоген-киназ (МАРК) [95, 166]. 3'-конец RAGE-1 идентичен МОК, а в других регионах, они совершенно различны. Это предполагает, что область МОК может быть абберрантно

вставлена в RAGE путем транслокации [166]. Выравнивание последовательностей, полученных из всех четырех последовательностей мРНК RAGE и MOK показало, что все экзоны почти на 100% идентичны, кроме некоторых различий на 5'-конце RAGE-3 или на 3'-конце мРНК RAGE-1, RAGE-2, RAGE-3 и MOK.

RAGE-4 содержит длинную OPC3' (269–832). 187 аминокислот белка, кодируемого этой OPC, представляют собой главный продукт мРНК RAGE-4. В составе такого белка имеется несколько эпитопов, способных презентироваться различными молекулами HLA [44, 94, 222]. Кроме того показано, что все мРНК RAGE кодируют белки разных размеров и разных последовательностей. Но они все имеют протеинкиназ-подобный домен и несколько сайтов фосфорилирования для протеинкиназ, которые фосфорилируют многие субстраты, вовлечённые в разные сигнальные пути и в контроль клеточного деления [166].

Обнаружена экспрессия мРНК RAGE-1 в нормальных тканях мозга, сердца, трахеи, и тимуса, а RAGE-2 в трахее и RAGE-4 в тестикулах [75]. Доказано, что мРНК RAGE-1, -2 и -3 присутствуют в разных здоровых тканях и отсутствуют в тестикулах, где наличие мРНК RAGE-4 было подтверждено секвенированием. Из всех представителей мРНК гена RAGE только мРНК RAGE-4 не обнаруживается в нормальных тканях кроме тестикул в отличие от мРНК RAGE-1, -2 и -3 [75, 90, 218].

Также было показано, что активность RAGE гена, как для большинства СТ генов, регулируется эпигенетически, и что экспрессия RAGE в RAGE-отрицательных клетках рака почки и клетках сарком, но не в других опухолевых клетках различных гистологий, индуцируется ДНК гипометилирующим агентом 5-aza-2-deoxycytidine (5-аза-CdR). Это предполагает, что системное введение 5-аза-CdR представляет перспективную стратегию повышения конститутивно низкого иммуногенного потенциала клеток рака почки [58].

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В работу были включены 50 больных раком почки на стадии $T_{0-4}N_{0-2}M_{0-1}$, проходивших стационарное лечение в Приволжском окружном медицинском центре в период с 2008 по 2010 год (Таблица. 2). Возраст больных находился в диапазоне от 34 до 72 лет, средний возраст составил 53 г. Всем пациентам проводились стандартные лечебные мероприятия, принятые в клинике онкологических заболеваний и включающие хирургическую резекцию.

Таблица 2 - Клинико-морфологические характеристики больных раком почки

Клинико-морфологические параметры		Количество образцов
Исследуемый материал	Образцы периферической крови	37 образцов
	Образцы опухолевых очагов	27 образцов
	Образцы сыворотки крови	50 образцов
Метастазы	Присутствуют	11/50 (48%)
	Отсутствуют	39/50 (52%)
Пол	Мужской	24/50 (48%)

	Женский	26/50 (52%)
Возраст (средний возраст 53 лет)	<53 лет	13/50 (26%)
	>53 лет	37/50 (74%)
Стадия заболевания	1 стадия	18/50 (20%)
	2 стадия	13/50 (51%)
	3 стадия	9/50 (18%)
	4 стадия	7/50 (10%)

Исследовано 30 образцов опухолевых очагов и 25 образцов периферической крови больных раком легких, проходивших лечение в ГУЗ Нижегородский областной онкологический диспансер. Клинико-морфологические характеристики были определены для 27 больных (Таблица 3). Возраст больных находился в диапазоне от 41 до 70 лет, средний возраст составил 55 лет.

Таблица 3 - Клинико-морфологические характеристики больных раком легких, включенных в исследование

Клинико-морфологические параметры		Количество образцов (%)
Стадия заболевания	1 стадия	11/27 (35)
	2 стадия	5/27 (35)
	3 стадия	8/27 (30)
	4 стадия	3/27 (35)
Локализация первичного опухолевого очага	Центральная	15/27 (65)
	Периферическая	10/27 (35)
	Левое легкое	11/27 (45)
	Правое легкое	14/27 (55)
Гистологический тип	Мелкоклеточный рак	4/27 (15)
	Плоскоклеточный рак	20/27 (80)
	Железистый рак	3/27 (5)
Метастазы	Присутствуют	11/27 (41)
	Отсутствуют	16/27 (59)

В исследование было включено 30 образцов опухолевых очагов и 29 образцов периферической крови больных раком толстой кишки, проходивших лечение в хирургическом отделении ГУЗ Нижегородская областная клиническая

больница им. Н.А. Семашко (Таблица. 4). Формирование группы больных осуществлялось после постановки диагноза на основании клинического, морфологического, эндоскопического, рентгенологического обследования и по результатам оперативного вмешательства. Возраст больных варьировал от 45 до 84 лет, средний возраст составил 65 лет.

Таблица 4 - Клинико-морфологические характеристики больных раком толстой кишки, включенных в исследование

Клинико-морфологические параметры		Количество образцов (%)
Стадия заболевания	1 стадия	6/30 (20)
	2 стадия	12/30 (40)
	3 стадия	9/30 (30)
	4 стадия	3/30 (10)
Локализация опухоли	Восходящая, поперечная и нисходящая ободочная кишка	8/30 (13)
	Сигмовидная кишка	3/30 (10)
	Ректо-сигмовидный отдел	4/30 (17)
	Прямая кишка	15/30 (43)
Степень дифференцировки опухоли	Высокая	3/30 (10)
	Умеренная	22/30 (77)
	Низкая	3/30 (10)
	Неустановлена	2/30 (3)
Метастазы	Присутствуют	12/30 (40)
	Отсутствуют	18/30 (60)

В работе использовали 27 образцов опухолевых очагов и 30 образцов периферической крови больных раком тела матки, проходивших лечение в гинекологическом отделении ФГУ Приволжского окружного медицинского центра ФМБА. Возраст пациентов с раком тела матки находился в интервале от 39 до 79 лет. Клиническое обследование пациенток проводил врачебный персонал соответствующего лечебного учреждения до медикаментозного и

хирургического лечения. Основаниями для постановки клинического диагноза пациенткам служили первичный опрос, анамнез, данные гинекологического осмотра, УЗИ, результаты гистологического и цитологического анализов. Исследование материала, полученного от больных раком тела матки, установило, что 13 из 30 образцов гистологически и цитологически соответствуют умереннодифференцированной аденокарциноме, 14 из 30 образцов – высокодифференцированной аденокарциноме, 3 из 30 образцов – низкодифференцированной аденокарциноме. Всем пациенткам проводилось плановое хирургическое лечение в объеме ампутации или экстирпации матки.

Для тестирования экспрессии гена RAGE также использовали лизаты клеток четырех перевиваемых линий рака почки A498, SN12C, ACHN и CaKi-1, полученные из банка клеток Российского Онкологического Научного Центра им. Н.Н.Блохина. Для выявления мРНК представителей раково-тестикулярных генов и альтернативных форм мРНК дифференцировочных генов исследовали также 30 образцов периферической крови практически здоровых добровольцев, А для определения растворимых дифференцировочных молекул использовали образцы сыворотки крови 50 здоровых добровольцев, полученных в городской клинической больницы № 34 (Нижний Новгород).

Основные буферные растворы и реактивы

Для выделения РНК использовали:

Лизирующий буфер следующего состава: 6 М гуанидин-тиоцианат (“AppliChem”, Германия), 1% Тритон X-100 (LOBA, Австрия), 25 мМ цитрат натрия (Panreac, Испания), pH 7.0. – 3 М ацетат натрия (pH 5.2) (Panreac, Испания).- Смесь фенол/хлороформ в соотношении 1:1 («Реактив», Россия). - Изопропиловый спирт, 75% этиловый спирт («Реактив», Россия).

Для проведения реакции обратной транскрипции:

Обратная транскриптаза M-MuLV (200 единиц активности в 1 мкл) - пятикратный (5×) M-MuLV буферный раствор для обратной транскрипции следующего состава: 250 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 50

мМ дитиотриэтола (“Fermentas”, Латвия) – Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, синтезировали в ЗАО «Синтол» (Москва), НПФ «Литех» (Москва), ООО «Бигль» (С.-Петербург)(Таблица. 5).

Таблица 5 - Олигонуклеотидные праймеры

СТ ген	Раунд ПЦР	праймеры			Размер ампликона	мРНК
		название	5'- 3' последовательность	Т°С		
MAGE-A (1-6)	1	MA-F1	ACTGAAGGAGAAGATCTGCC	55	265	NM_004988.4 NM_005361.3 NM_005362.3 NM_002362.4 NM_021049.4 NM_005363.2
		MA-R1	GTGCTTGGCCCCCTCCTCTTC			
	2	MA-F2	AGAAGATCTGCC <u>W</u> GTGGGTC*	58		
		MA-R2	CTGGAGGCTCCCTGAGGACT			
MAGE-C1 (CT7)	1	CT7-R1	CAGGACAACCTCTGAGGACTC	54	138	NM_005462.4
		CT7-F1	CCTATCCAGTCTTCAAGGTG			
	2	CT7-F2	AGTGCCAGGAGTCAAGGTTC	56		
		CT7-R2	GCATATCCTTGTCCCCCATG			
XAGE-1	1	X-R1	TTGTTTCAGCTTGTCTTCAT	55	162	NM_001097592 NM_001097594
		X-F1	CTACTGAGACACGGCGGACA			
	2	X-F2	ATACAGCTGAGATCCCAGTG	60		
		X-R2	TTGTGGTTGCTCTTCACCTG			
GAGE(1-8)-PAGE1	1	GP-R1	TCCAACA <u>Y</u> AGGAGCAGCCTG*	55	296	NM_001468 NM_001472 NM_001473 NM_001474 NM_001475 NM_001476 NM_001477 NM_012196 NM_003785
		GP-F1:	ATTGGGCCTATGCGGCCCCGA			
	2	GP-F2	AGCATCTGCAG <u>S</u> TCAAGGGC*	56		
		G-R2:	TCTTTTAACACTGTGATTGC			
		P-R2	CGTAGACCAATGATCTATGT			

TRAG-3	1	T-R1	TTGTGGTCCCCGCTATGGCTC	56	159	NM_001080848
		T-F	AGAAGCCCTATCAAAGTTCC			
	2	T-R2	TCGTTCGGCTGGTCAGAGTG	60		
		T-F	AGAAGCCCTATCAAAGTTCC			
HAGE	1	H-R1	TCCTTTGACCTTTAAGGCTG	54	186	NM_018665.2
		H-F1	AACAAAGTGGGCAGATTAC			
	2	H-F2	AGCAGATAGTTGGAGGAAAG	58		
		H-R2	GGCCATGCCTGTGACTGAAT			
NY-ESO-1	1	NY-R1	TCTGCAGCAGTCAGTCGGAT	55	159	NM_001327.2
		NY-F1	AGAGCCGCCTGCTTGAGTTC			
	2	NY-F2	CCTGCTTGAGTTCTACCTCG	60		
		NY-R2	GCAGTCAGTCGGATAGTCAG			
IL-2RA/CD25	1	CD25-F1	CTGGCTGCCAGGCAGAGCTC	53	454 CD25, 238 CD25Exo4Del, 166 CD25Exo4-5Del	NM_000417.2 AF_008556.1
		CD25-R1	TGACTTCTGTTGTCTGTTC C			
	2	CD25-F2	AATGCACAAGCTCTGCCACT	57		
		CD25-R2	GTCTCCATGGTTGCAGCCAT			
FAS/CD95	1	FAS-R1	TAGACCAAGCTTTGGATTTC	50	582 FAS-A(CD95) 519 FAS-B (CD95Exo6Del)	NM_000043.4
		FAS-F1	CGGAGGATTGCTCAACAACC			
	2	FAS-F2	ATGCTGGGCATCTGGACCCT	60		
		FAS-A	TTCCTTTCTCTTCACCCA A			
		FAS-B	TTCCTTTCTCTTCACTTC C			
ICAM-1/CD54	1	IC-R1	TGTTCA GTGTGGCACCCTG	54	269 CD54 250 TMR	NM_000201.2
		IC-F1	GTGACCATCTACAGCTTTCC			
	2	IC-F2	AGCTTCGTGTCCTGTATGGC	50		
		IC-R2	CTCATACCGGGGGGAGAGCA			
		IC-TMR	CTCATACCGGGGGGCTCGCG			

* – для обозначения вырожденных оснований использован общепринятый код: S – C/G, W – T/A, Y – T/C
F – (Forward) прямой праймер, R – (Reverse) обратный праймер. T°С Температура отжига праймеров °С

Для проведения полимеразной цепной реакции:

Десятикратный (10×) буферный раствор для Taq-полимеразы: 100 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 15 мМ MgCl₂ (Panreac, Испания), 500 мМ KCl. - Taq-ДНК-полимераза в буфере для хранения (5 единиц активности в 1 мкл) («Генные и клеточные технологии», Россия). – 8 мМ раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов: по 20 мкл каждого из 4 дезоксинуклеозидтрифосфатов (НПФ «Литех», Россия), 920 мкл воды без нуклеаз. - Пятидесятикратный (50×) концентрат трис-ацетатного буферного раствора: 24.2 г трис-(гидроксиметил) аминметана (“SERVA”, США), 5.7 мл ледяной уксусной кислоты («Реактив», Россия), 10 мл 0.5 М раствора этилендиаминотетрауксусной кислоты (pH 8.0) (“Sigma”, США).

Для проведения электрофореза в агарозном геле:

Однократный рабочий трис-ацетатный электродный буферный раствор: один объём пятидесятикратного трис-ацетатного буферного раствора и 49 объёмов дистиллированной воды. Пятидесятикратный концентрат (50X) содержит 24,2 г трис-(гидроксиметил) аминметана, 5,7 мл ледяной уксусной кислоты, 10 мл 0,5 М раствора ЭДТА, pH 8.0. - Десятикратный (10×) буферный раствор для нанесения проб содержит 5-10% глицерина, 7% сахарозы или 2.5% фикола, 0.025% бромфенолового синего в дистиллированной воде. - 1.5% агарозный гель: 1.5 г агарозы («Хеликон», Россия), 100 мл рабочего трис-ацетатного электродного буферного раствора, 10 мкл 10%-ного водного раствора этидиум бромид. - Маркер молекулярной массы (ЗАО НПФ "ДНК-технология", Россия).

Для определения нуклеотидной последовательности с помощью

секвенирования:

Набор DNA Extraction Kit («Fermentas», Латвия): Связывающий буфер (Binding solution), Сорбент суспензии Silica (silica powder suspension), Отмывочный буфер содержащий 50% этанола (Wash buffer). - Набор BigDye

Terminator v 3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems», США): Приготовленная реакционная смесь (BigDye Terminator Ready Reaction Mix), буферный раствор для секвенирования BigDye Seq Buffer, Formamide.

Для проведения иммуноферментного анализа:

Для промывания планшетов с иммуносорбентом, разведения исследуемых/контрольных образцов и конъюгата использовали фосфатно-солевой раствор (ФСР-Т), содержащий 0,9% NaCl, 0,1% Na₂HPO₄, 0,1% твин-80 (допустимый интервал pH 7.2-7.6). Раствор ортофенилендиамина: 10 мг ортофенилендиамина в 10 мл 0,1 М цитратного буферного раствора (pH 4.9-5.1), содержащего 0,05% перекиси водорода. Для остановки ферментативной реакции использовали 5%-ный раствор серной кислоты (стоп-реагент). Для создания конъюгатов с пероксидазой хрена (Онкологический научный центр АМН РФ, г. Москва) применяли моноклональные антитела описанные в таблице 6.

Таблица 6 - Используемые моноклональные антитела

Наименование антител	Наименование молекул дифференциации по CD-классификации	Другие названия молекул
ИКО-105	CD25	IL-2RA
ИКО-184	CD54	ICAM-1
ИКО-160	CD95	Fas/Apo1

2.2.Методы исследования

Забор биологического материала для исследования проводили до полудня натощак. Использовали кровь, взятую из наружной поверхностной вены руки до хирургического вмешательства, и опухолевую ткань. Образец исследуемой ткани смешивали в соотношении 1:1 с лизирующим буферным раствором

вышеприведённого состава. Биологические образцы хранили при -20°C до использования.

Выделение тотальной РНК

Выделение тотальной РНК проводили по методике, предложенной P.Chomyszynski и коллегами [54]. Для выделения РНК к 200 мкл исследуемого образца добавляли 200 мкл лизирующего буфера с pH 7.0, 100 мкл 3 М ацетата натрия с pH 5.2 (взаимодействует с РНК, что ведет к образованию натриевой соли НК) и перемешивали на лабораторном вортексе «Rotamix RM-1» (ELMI, Латвия). Затем добавляли 500 мкл смеси фенола с хлороформом (для денатурации белков и растворения липидной фракции). Полученную смесь перемешивали с последующим центрифугированием при 16 тыс.об./мин. в течение 15 минут на центрифуге “Centrifuge CM-50” (ELMI, Латвия). Вслед за этим переносили 200 мкл водной (верхней) фазы в пробирку с 200 мкл изопропанола для осаждения РНК, перемешивали. Инкубировали при -20°C в течение 30 минут и более, центрифугировали при 16 тыс.об./мин. в течение 15 минут, удаляли супернатант (надосадочную жидкость), стараясь не захватить осадок. Осадок промывали 800 мкл холодного 75%-го этанола, перемешивали и центрифугировали 5 минут при 16 тыс.об./мин., удаляли надосадочную жидкость, стараясь не захватить осадок. Полученный осадок подсушивали в суховоздушном термостате “ТС-1/80 СПУ” (Россия) при 37°C или при комнатной температуре до исчезновения запаха спирта (10 – 15 минут). К осадку добавляли 20 мкл бидистиллированной воды свободной от нуклеаз (получали в приборе «Milli-Q system», США), перемешивали на вортексе и хранили при -20°C до использования.

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили по методике, предложенной J. Sambrook и коллегами [201]. Обратную транскрипцию ставили в объёме 10 мкл. В подписанную микроцентрифужную пробирку “Eppendorf”

объёмом 0.5 мл вносили 4 мкл мРНК и 1 мкл обратного олигонуклеотидного праймера R1. Первичная структура используемых в работе праймеров приведена в таблице 5. Полученную смесь перемешивали на многоскоростном вортексе “REAX top” (Heidolph, Германия) и покрывали 1-2 каплями минерального масла (ICN Biomedicals, США). Далее смесь денатурировали при 94°C в течение одной минуты в амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-Технология», Россия) и охлаждали при комнатной температуре. Затем к РНК под масло вносили 5 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл пятикратного М-MuLV буферного раствора для обратной транскрипции, 0.5 мкл 8 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0.2 мкл М-MuLV обратной транскриптазы и 2.3 мкл воды, свободной от нуклеаз, после чего смесь перемешивали пипетированием и инкубировали в амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) при 42°C в течение 30 минут для синтеза комплементарной ДНК (кДНК), а затем при 94°C – 5 минут для инактивации фермента. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при -20°C до использования.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразную цепную реакцию проводили по методике «гнездовой» ПЦР (nested-PCR) предложенной J. Sambrook и коллегами [201]. «Гнездовая» полимеразная цепная реакция проводится в два этапа, что соответствует использованию двух пар прямого и обратного олигонуклеотидных праймеров, специфичных для мРНК каждого индивидуального раково-тестикулярного гена или каждого дифференцировочного гена. Это позволяет увеличить чувствительность реакции и повысить ее специфичность.

Первый раунд гнездовой ПЦР:

Реакцию первого этапа ПЦР проводили в объёме 25 мкл. В микроцентрифужную пробирку “Eppendorf” объёмом 0.5 мл (SSI, США) вносили 17 мкл бидистиллированной воды, 2.5 мкл десятикратного буферного

раствора для Taq-полимеразы, 2.0 мкл 8 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0.5 мкл прямого праймера F1, 0.5 мкл обратного праймера R1 (Таблица. 5), 0.5 мкл Taq-ДНК-полимеразы и 2 мкл полученной в ОТ кДНК. Полученную реакционную смесь перемешивали на вортексе “REAX top” (Heidolph, Германия), центрифугировали и покрывали 1-2 каплями минерального масла (AppliChem, Германия). Затем проводили 35 циклов амплификации по следующей программе: 94°C – 30", Т°C – 30", 72°C – 30". (Т°C – температура отжига праймеров соответствующая каждому из представителей раково-тестикулярных генов и альтернативных форм мРНК дифференцировочных генов (Таблица. 5)).

Второй раунд гнездовой ПЦР

Второй этап гнездовой ПЦР проводили в объеме 25 мкл. В пробирку “Eppendorf” объемом 0.5 мл вносили 2.5 мкл десятикратного (10×) буферного раствора для Taq-полимеразы, 2.0 мкл 8 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 1 мкл смеси прямых и обратных праймеров, индивидуальных для каждого гена (Таблица. 5), 0.5 мкл раствора Taq-полимеразы, 17 мкл бидистиллированной воды и 2 мкл смеси ДНК, полученной при проведении первого раунда ПЦР. Полученную реакционную смесь перемешивали на вортексе “REAX top” (Heidolph, Германия), центрифугировали на вортекс-центрифуге “СМ 70 М-07 Sky Line” (ELMI, Латвия) и покрывали 1-2 каплями минерального масла. Затем в амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) проводили 30 циклов амплификации по следующей программе: 94°C – 30", Т°C – 30", 72°C – 30". (Т°C – температура отжига праймеров соответствующая каждому из представителей раково-тестикулярных генов и альтернативных форм мРНК дифференцировочных молекул (Таблица. 5)).

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Полученные в ходе ПЦР результаты оценивали методом электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле, предложенным Т. Маниатисом и коллегами [10]. Готовили 1.5% агарозный гель. Полученную суспензию 1.5% агарозного геля нагревали на плитке до полного растворения агарозы, периодически помешивая. Раствор охлаждали и заливали в форму для агарозного блока, ставили гребенку для образования лунок и давали агарозе застыть до состояния геля. После застывания агарозы гребенку вынимали, гель переносили в камеру для горизонтального электрофореза «SE-2» (Хеликон, Россия), заполненную рабочим трис-ацетатным электродным буферным раствором. Гель ориентировали лунками к отрицательному электроду. Из-под слоя масла отбирали 10 мкл раствора амплифицированной ДНК и смешивали его с 1.0 мкл десятикратного концентрата буферного раствора для нанесения проб. Полученную смесь переносили в лунки геля, в одну из лунок вносили 10 мкл маркера молекулярной массы. Электрофорез проводили в течение 30-40 минут при напряжении 170 вольт и силе тока 250 миллиампер. Затем ток отключали. Гель переносили в камеру трансиллюминатора с фотографической насадкой «E-BOX System 1000/20M» (VILBER LOURMAT, Франция) и просматривали в УФ свете при длине волны 254нм, а результат регистрировали и документировали с использованием системы видеодокументирования «VILBER LOURMAT» (Франция).

Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Для определения нуклеотидной последовательности, сначала проводили очистку амплифицированного фрагмента ДНК. Данную процедуру проводили с помощью набора для выделения ДНК из агарозных гелей DNA Extraction Kit согласно рекомендациям производителя. Сначала вырезали фрагменты ДНК из агарозного геля и помещали в 800 мкл связывающего буфера и инкубировали при 37°C до полного растворения агарозы. Добавляли 5 мкл сорбента

суспензии Silica, ресуспендировали на вортексе. Далее инкубировали раствор при 55°C в течение 15 мин для полного связывания ДНК с сорбентом. Затем, сорбент со связавшейся ДНК осаждали центрифугированием в течение 30 сек при 16 тыс.об./мин. Надосадочную жидкость (связывающий буфер и остатки агарозы) удаляли. С помощью отмывочного буфера сорбент со связавшейся ДНК отмывали от остатков связывающего буфера не менее 3 раз. После удаления отмывочного буфера, осадок подсушивали на воздухе около 10 мин. Сорбент со связавшейся ДНК ресуспендировали в 25 мкл бидистиллированной воды. Суспензию инкубировали при 55°C в течение 5 мин для элюирования ДНК с сорбента в раствор. Затем смесь центрифугировали 30 сек при 14,5 тыс.об./мин, надосадочную жидкость (раствор ДНК в воде) отбирали в чистую пробирку и хранили при -20°C.

Для концентрирования нуклеиновых кислот, к 20 мкл раствора ДНК добавляли 5 мкл 3 М ацетата натрия и 30 мкл изопропанола. Далее центрифугировали 15 мин при 14,5 тыс.об./мин. Затем убирали надосадочную жидкость и к осадку добавляли 150 мкл этанола и далее центрифугировали при 14,5 тыс.об./мин в течение 3 мин, надосадочную жидкость убирали. Полученную смесь высушивали при 37°C 30 мин. Затем добавляли 20 мкл бидистиллированной воды.

Реакцию терминирования проводили с использованием набора BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit. К 5 мкл очищенной ДНК добавляли 0,5 мкл приготовленной реакционной смеси BigDye, 2 мкл 5× буферного раствора BigDye, 0,5 мкл праймера F2 или R2 (Таблица. 5) и 2 мкл бидистиллированной воды, инкубировали в амплификаторе «2720 Thermal Cycler» («Applied Biosystems», США) при 96°C в течение 5 мин и проводили 25 циклов ПЦР по следующей программе: (96°C – 10с, 50°C – 5с, 60°C – 4мин). Затем преципитировали 10 мкл ДНК 25 мкл изопропанолом в присутствии 10 мМ

ацетата-Na и осаждали центрифугированием 15 мин при 14,5 тыс.об/мин. Осадок промывали 150 мкл 70% этанола и осаждали центрифугированием 1 мин при 14,5 тыс.об./мин. После этого надосадочную жидкость убрали и осадок высушивали до исчезновения запаха этанола. Затем разводили осадок в 20 мкл деионизованного формамида и нагревали до 95°C в течение 5 мин. Далее проводили электрофорез одноцепочечной ДНК в приборе ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer (США) согласно инструкции производителя.

Компьютерный анализ данных

Для компьютерного анализа данных в работе использовали пакет программ «Lasergene» согласно рекомендациям производителя. Анализ первичной структуры ДНК и матричной РНК осуществляли с использованием программы MapDraw данного пакета. Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили в программе MegAlign. Подбор олигонуклеотидных праймеров осуществляли, используя программу PrimerSelect пакета Lasergene и программу Oligo Calculator v 10 (Россия).

Иммуноферментный метод

Сывороточное содержание растворимых форм дифференцировочных молекул CD25, CD54 и CD95 в сыворотке крови больных раком почки определяли двух сайтовым иммуноферментным методом. Сывороточный уровень определяли с использованием в качестве подложки поликлональных антител, направленных против поверхностных антигенов лимфоцитов периферической крови человека, и мышинных моноклональных антител серии ИКО (Таблица. 6), конъюгированных с ферментом пероксидазой корня хрена.

Антитела в концентрации 5-10 мкг/мл и объемом 100 мкл иммобилизовывали на разборных полистироловых планшетах («ВНИИ Медполимер», г. Москва), инкубируя во влажной камере при температуре 25°C в течение 24 часов. Затем планшеты отмывали 6 раз фосфатно-солевым раствором (ФСР-Т). В первый ряд лунок сорбированного планшета вносили по

100 мкл положительной контрольной сыворотки. В остальные лунки планшета вносили по 100 мкл исследуемых образцов сыворотки. Исследуемые образцы сывороток предварительно разводили раствором ФСР-Т 1:1. Планшеты инкубировали 24 часа при комнатной температуре и отмывали, как описано выше.

Затем во все лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгата в рабочем разведении. Планшет инкубировали 1 час при температуре 42°C и промывали 6 раз ФСР-Т. Во все лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора ортофенилендиамина и выдерживали 10-15 мин при температуре 25°C в темном месте. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя во все лунки по 50 стоп-реагента. Затем проводили учет результатов ИФА. Учет результатов проводили спектрофотометрически при длине волны 492 нм с использованием фотометра АИФ-М/340 (Россия). Результаты оценивали, переводя единицы оптической плотности в условные единицы (U/ml). На основании раститровки положительного контроля строилась калибровочная кривая. За 1000 U/ml принимали значение оптической плотности, соответствующее рабочему разведению исследуемых образцов сывороток.

Определение сывороточное содержание растворимых форм дифференцировочных молекул в сыворотке крови больных раком почки проводили совместно с Н.Б. Пресняковой (ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной»).

Статистический анализ результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 10.0. Анализ различий относительных частот обнаружения мРНК в группах проводили с использованием статистического критерия сравнения пропорций. Для представления исследованных количественных показателей были использованы медиана, 25 и 75 процентиля. Межгрупповой анализ количественных показателей проводили с

использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ

Для опухолевых клеток характерно изменение профиля экспрессии генов, в частности, в опухолевых клетках могут включаться не работающие в клетках-предшественниках гены иммунного ответа. Наряду с этим в опухолевых очагах присутствуют опухоль-инфильтрирующие лимфоциты и другие клетки иммунной системы для которых характерна экспрессия набора генов, вовлеченных в иммунный ответ. Примером таких генов служат гены, кодирующие молекулу адгезии CD54/ICAM-1, молекулу активации CD25/IL-2R α и молекулу, опосредующую апоптоз CD95/Fas. Первая часть проведенных нами исследований по анализу транскриптома клеток при раке почки (РП) сосредоточено на анализе транскрипции генов, кодирующих дифференцировочные молекулы иммунной системы человека (ICAM-1, IL-2R α и Fas), непосредственным образом вовлеченных в реализацию иммунного ответа на развитие опухоли.

Проведено сравнение паттернов экспрессии мРНК CD54, CD25 и CD95 и их делетированных форм в крови и в опухолевых очагах больных РП. При

исследовании образцов периферической крови больных РП и здоровых добровольцев на наличие мРНК CD54, CD25 и CD95 установлено, что во всех исследованных пробах крови обнаруживалась полноразмерная форма мРНК всех исследуемых генов.

Ген CD25/IL-2R α экспрессировался в образцах периферической крови, а также в образцах опухолей больных РП в трех формах мРНК: полноразмерная форма мРНК IL-2RA, форма мРНК с делецией четвертого экзона, ответственного за связывание IL-2 (CD25Exo4Del) и вариант мРНК IL-2RA без экзонов 4 и 5 (CD25Exo4-5Del). мРНК IL-2R α с делецией четвертого экзона была детектирована в 65% образцов крови больных. Вариант сплайсинга мРНК IL-2R α без 4 и 5 экзонов в исследуемых образцах выявлен в 32% случаев (Рисунок.5).

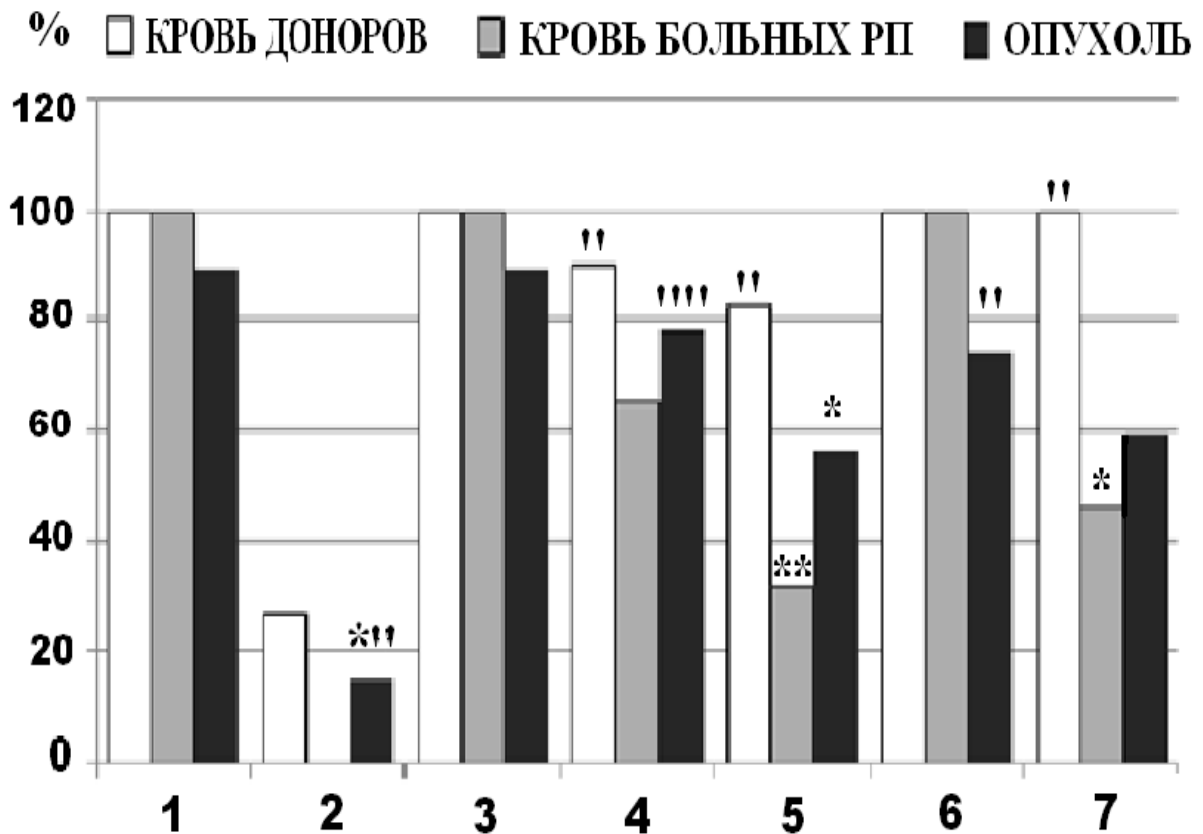


Рисунок. 5. Частота обнаружения различных форм мРНК дифференцировочных генов в крови и образцах опухолей больных раком почки и в крови здоровых доноров.

1- CD54, 2- CD54TMDel, 3- CD25, 4- CD25Exo4Del, 5- CD25Exo4-5Del, 6- CD95, 7- CD95Exo6Del.

Статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения: *- мРНК полноразмерной формы ($p < 0,05$); * - мРНК CD25Exo4Del: ($p < 0,01$); "- мРНК в крови больных ($p < 0,05$); ""- мРНК CD54TMDel: ($p < 0,001$).

Форма мРНК CD25Exo4Del чаще содержалась в образцах крови, чем форма, кодирующая CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$). Частота детекции обеих укороченных форм мРНК была статистически значимо ниже частоты детекции полноразмерной формы ($p < 0,05$) и ниже, чем у здоровых лиц, у которых мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del встречалась в 90% и 83% случаев, соответственно ($p < 0,05$).

При исследовании образцов опухолей больных РП обнаружено, что ген IL-2RA экспрессировался в 93% случаев (25 из 27 случаев). У двух больных не зафиксировано ни одной из форм мРНК IL-2R α . В 89% случаев (24 из 27) детектирована мРНК полноразмерной формы IL-2R α , альтернативные формы мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del обнаружены в 78% (21 из 27) и 56% (15 из 27) образцов, соответственно. Количество случаев детекции сплайсингового варианта мРНК IL-2R α без экзонов 4 и 5 было значительно ниже, чем количество случаев детекции полноразмерной формы мРНК ($p < 0,05$).

Экспрессия гена CD54/ICAM-1 в опухолевых очагах больных РП обнаружена в виде полноразмерной формы мРНК ICAM-1, кодирующей мембранный белок, и укороченной формы мРНК без участка, кодирующего трансмембранный домен (CD54TMDel). Встречаемость мРНК мембранной и делетированной форм ICAM-1 в опухолях больных РП составила 89% (24 из 27 образцов) и 15% (4 из 27 образцов) соответственно. Частота обнаружения

мРНК мембранной формы ICAM-1 была достоверно выше, чем частота обнаружения делетированной формы ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что вариант мРНК, кодирующий альтернативную форму ICAM-1, встречался только в тех образцах, где была выявлена мРНК мембранной формы. В образцах крови больных РП обнаружена только мРНК мембранной формы ICAM-1 (Таблица 7).

Таблица 7 - Частота обнаружения мРНК дифференцировочных генов и их альтернативных форм в крови и в образцах опухолей больных раком почки

мРНК	кровь доноров	кровь больных РП	опухоль
CD54	30/30	37/37	24/27
CD54TMDel	8/30	0/37	4/27*, "
CD25	30/30	37/37	24/27
CD25Exo4Del	27/30"	24/37	21/27""
CD25Exo4-5Del	25/30"	12/37*, ^	15/27*
CD95	30/30	37/37	20/27"
CD95Exo6Del	30/30"	17/37*	16/27

Статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения:

* – мРНК полноразмерной формы $p < 0,05$. ^ – мРНК CD25Exo4Del $p < 0,01$.

" – мРНК в крови $p < 0,05$. "" – мРНК CD54TMDel $p < 0,05$.

При анализе экспрессии гена, кодирующего CD95/Fas, у больных РП с помощью использованных методов обнаружено две формы мРНК - полноразмерная форма мРНК CD95, кодирующая мембранный белок, и форма мРНК с делецией шестого экзона, кодирующего трансмембранный домен (CD95Exo6Del/FasTMDel). В образцах периферической крови мРНК CD95 с делецией шестого экзона была детектирована в 46% образцов периферической крови (17 из 37 образцов), что оказалось статистически значимо реже, чем

частота встречаемости полноразмерной формы ($p < 0,05$). У здоровых лиц она была выявлена во всех протестированных пробах.

В опухолевых очагах больных РП экспрессия гена Fas обнаружена в 81% случаев (22 из 27 образцов). Мембранная форма мРНК Fas встречалась лишь в 74% случаев (20 из 27 тестированных образцов), а мРНК CD95Exo6Del обнаружена у 16 из 27 лиц (59% случаев). Различия в частоте встречаемости полноразмерной формы мРНК CD95 в опухолевых очагах в сравнении с частотой встречаемости данной мРНК в образцах крови больных, а также здоровых добровольцев были статистически достоверны ($p < 0,05$).

Матричная РНК ICAM-1 встречалась в образцах опухолей всех больных с метастазами. У больных без метастазов мРНК ICAM-1 была обнаружена лишь в 83% случаев. В то же время, наличие мРНК, кодирующей делетированную форму (CD54TMDel), не наблюдалось ни в одном образце больных с метастазами. В образцах больных, не имеющих метастазов, мРНК альтернативной формы ICAM-1 детектировалась в 22% случаев (4 из 18 образцов). То есть мРНК CD54TMDel выявлялась в опухолях в отсутствие метастазов. Частота детекции мРНК ICAM-1 оказалась статистически значимо выше, чем частота детекции мРНК CD54TMDel как у больных с метастазами, так и у больных без метастазов ($p < 0,05$).

Экспрессия мРНК гена CD25 в опухолевых очагах больных РП при наличии метастазов была зафиксирована во всех образцах, в которых встречалась полноразмерная форма, а формы мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del были обнаружены в 77% и 22% случаев, соответственно. Отсутствие метастазов сопровождалось снижением частоты обнаружения мРНК CD25 (83%) и повышением частоты детекции мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del (78% и 72% соответственно), что оказалось статистически значимо для CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$). У пациентов без метастазов подобные различия отсутствовали. Однако, наблюдалась тенденция к уменьшению частоты

обнаружения мРНК в ряду «CD25 – CD25Exo4Del – CD25Exo4-5Del» (Таблица.8).

Таблица 8 - Встречаемость разных форм мРНК дифференцировочных генов в крови и в опухолях больных РП при наличии или отсутствии метастазов (%)

мРНК	Кровь		опухоль	
	Метастазы+	Метастазы-	Метастазы+	Метастазы-
CD54	11/11 (100) °	26/26 (100) °	9/9 (100) °	15/18 (83) °
CD54TMDel	0/11 (0)	0/26 (0)	0/9 (0)	4/18 (22)
CD25	11/11 (100)	26/26 (100)	9/9 (100)	15/18 (83)
CD25Exo4Del	9/11 (82)	15/26 (58)*	7/9 (77)	14/18 (78)
CD25Exo4-5Del	5/11 (45)*	7/26 (27)**,*	2/9 (22)*	13/18 (72)"
CD95	11/11 (100)	26/26 (100)	4/9 (44)	16/18 (89)'''
CD95Exo6Del	5/11 (45)*	12/26 (46)*	3/9 (33)	13/18 (72)

Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с частотой обнаружения: " – мРНК в крови; * - мРНК полноразмерной формы; ° – мРНК делетированной формы; ** – мРНК CD25Exo4Del; ''' - мРНК у больных с метастазами.

Таким образом, выявление делетированных форм мРНК CD25 в опухолевых очагах больных РП было ассоциировано с отсутствием метастазов, характерным для благоприятного течения заболевания. При анализе частоты встречаемости спайсинговых форм мРНК CD25 в крови больных, имеющих и не имеющих метастазы статистически значимых различий обнаружено не было. Но в отсутствие метастазов частота обнаружения мРНК CD25Exo4Del была статистически значимо ниже частоты обнаружения полноразмерной формы ($p < 0,05$). У больных без метастазов частота встречаемости мРНК CD25Exo4-5Del была достоверно ниже частоты обнаружения мРНК CD25Exo4Del. Частота детекции мРНК CD25Exo4-5Del была также ниже

частоты выявления мРНК полноразмерной формы как у больных с метастазами, так и у больных без метастазов ($p < 0,05$).

Матричная РНК CD95 была выявлена в опухолевых очагах при наличии метастазов лишь в 44% случаев, а мРНК CD95Exo6Del - в 33%. При отсутствии метастазов частота детекции обеих форм мРНК возрастала и составила 72% случаев для мРНК CD95Exo6Del и 89% случаев для мРНК CD95. Обнаружены статистически значимые различия в сравнении с больными, имеющими метастазы ($p < 0,05$). Как у больных с метастазами, так и у больных без метастазов частота встречаемости мРНК CD95 и мРНК CD95Exo6Del в крови больных статистически значимо не различалась. Также не выявлено статистически значимых различий между частотой детекции этих сплайсинговых вариантов в крови больных с метастазами и без метастазов. Но частота обнаружения мРНК CD95Exo6Del была достоверно ниже частоты выявления полноразмерной формы как у больных с метастазами, так и у больных без метастазов ($p < 0,05$).

При раке почки сплайсинговые варианты мРНК IL-2R α встречались в образцах опухолевых очагов больных на всех четырех стадиях заболевания (Таблица.9). Полноразмерная форма мРНК CD25 в 82% случаев определена в опухолевых очагах на первой стадии, а мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del обнаружена в 73% случаев. У больных на второй стадии рака почки мРНК CD25 и мРНК CD25Exo4Del выявлялись одинаково в 86% случаев, а мРНК CD25Exo4-5Del - в 71% случаев. На третьей стадии укороченная форма мРНК CD25Exo4Del встречалась в 80% случаев, а мРНК CD25Exo4-5Del встречалась у 20% больных. Почти с такой же частотой обнаруживались данные формы мРНК на четвертой стадии. мРНК CD25Exo4Del выявлялась у 75% больных, а мРНК CD25Exo4-5Del – у 25% больных. Матричная РНК CD25 обнаруживалась во всех исследованных пробах на третьей и четвертой стадиях,

и частота ее детекции была статистически значимо выше, чем частота детекции формы мРНК CD25Exo4-5Del ($p<0,05$). В отношении мРНК CD25Exo4Del подобные различия не наблюдались.

Таблица 9 - Встречаемость разных форм мРНК дифференцировочных генов в опухолях больных раком почки на разных стадиях заболевания (%)

мРНК	Стадия заболевания			
	1	2	3	4
CD54	8/11 (73)	7/7 (100) [°]	5/5 (100) [°]	4/4 (100) [°]
CD54TMDel	4/11 (36)	0/7 (0)	0/5 (0)	0/4 (0)
CD25	9/11 (82)	6/7 (86)	5/5 (100)	4/4 (100)
CD25Exo4Del	8/11 (73)	6/7 (86)	4/5 (80)	3/4 (75)
CD25Exo4-5Del	8/11 (73)	5/7 (71)	1/5 (20)*	1/4 (25)*
CD95	9/11 (82)	7/7 (100)	3/5 (60)	1/4 (25)**
CD95Exo6Del	7/11 (64)	6/7 (86)	2/5 (40)	1/4 (25)

Статистически значимые различия ($p<0,05$) по сравнению с частотой выявления: * – мРНК полноразмерной формы. [°] – мРНК делетированной формы. ** – мРНК на второй стадии.

В крови больных наблюдалась незначимая тенденция к повышению частоты детекции обеих делетированных форм мРНК CD25 от первой к четвертой стадии. На первой стадии РП частота встречаемости обеих делетированных форм мРНК CD25 была статистически значимо ниже частоты выявления полноразмерной формы мРНК. На второй стадии, подобные различия наблюдались только для мРНК CD25Exo4-5Del ($p<0,05$)(Таблица. 10).

Таблица 10 - Встречаемость разных форм мРНК дифференцировочных генов в крови больных раком почки на разных стадиях заболевания (%)

мРНК	Стадия заболевания			
	1	2	3	4
CD54	18/18 (100) [°]	8/8 (100) [°]	6/6 (100) [°]	5/5 (100) [°]
CD54TMDel	0/18 (0)	0/8 (0)	0/6 (0)	0/5 (0)

CD25	18/18 (100)	8/8 (100)	6/6 (100)	5/5 (100)
CD25Exo4Del	9/18 (50)*	6/8 (75)	5/6 (83)	4/5 (80)
CD25Exo4-5Del	5/18 (28)*	2/8 (25)*	3/6 (50)	2/5 (40)
CD95	18/18 (100)	8/8 (100)	6/6 (100)	5/5 (100)
CD95Exo6Del	6/18 (75)*	6/8 (75)	3/6 (50)	2/5 (40)

Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с частотой выявления: * – полноразмерной формы. ° – мРНК делетированной формы.

Количество мРНК ICAM-1-положительных образцов опухолевых очагов статистически значимо повышалось с увеличением стадии заболевания. Если на первой стадии частота встречаемости мРНК ICAM-1 составила 73% случаев, то на последующих стадиях (2, 3, 4 стадии) она равнялась 100% ($P < 0,05$). Матричная РНК CD54TMDel обнаружена только на первой стадии РП (36% больных). То есть обнаружение мРНК делетированной формы ICAM-1 в опухолях почки было ассоциировано с начальной стадией развития рака почки.

Экспрессия мРНК гена, кодирующего молекулу CD95, была зафиксирована в опухолях больных на всех стадиях РП. На первой стадии мРНК мембранной формы CD95 детектировалась в 82% случаев, а мРНК CD95Exo6Del - в 64%. Максимальная частота детекции мРНК CD95 у больных зарегистрирована на второй стадии, мРНК CD95 была обнаружена во всех исследованных образцах, а мРНК CD95Exo6Del встречалась в 86% случаев. С третьей стадии частота обнаружения сплайс-вариантов мРНК начинала уменьшаться, обнаруживаясь в 60% и 40% случаев (мРНК CD95 и CD95Exo6Del, соответственно). На четвертой стадии оба сплайс-варианта мРНК обнаруживались реже, чем на других стадиях (25% для обеих мРНК). Для мРНК CD95 эта величина была статистически значимо ниже, чем на второй стадии для CD95 ($p < 0,05$), а для мРНК CD95Exo6Del выявлена выраженная тенденция к понижению, которая не была статистически значима (Таблица.9).

Анализ частоты обнаружения сплайс-вариантов мРНК CD95 в периферической крови больных не выявил статистически значимых различий на разных стадиях рака почки. Но на второй стадии частота обнаружения мРНК CD95Exo6Del (75%) была достоверно ниже частоты выявления полноразмерной формы (100%) ($p < 0,05$).

При сравнении частоты обнаружения полноразмерной мРНК дифференцировочных генов и их делетированных форм в опухолевых очагах больных РП были найдены статистически достоверные различия между встречаемостью мРНК разных генов. Так, мРНК CD25Exo4-5Del обнаруживалась достоверно чаще в опухолевых очагах, содержащих мРНК CD54TMDel и CD95Exo6Del ($p < 0,05$). Матричная РНК CD95Exo6Del также встречалась в опухолевых очагах, содержащих CD54TMDel, статистически значимо чаще ($p < 0,05$).

В образцах опухолей больных РП, содержащих мРНК CD54TMDel или CD25Exo4-5Del, частота обнаружения мРНК Fas была статистически значимо выше ($p < 0,05$). Для мРНК CD54 была зарегистрирована лишь тенденция к увеличению. Матричная РНК IL-2RA была обнаружена во всех образцах, положительных на мРНК Fas. Известно, что подавление программируемой гибели в опухолевых клетках связано с повышенной экспрессией антиапоптотических генов Bcl-XL или Bcl-2 индуцируемой гиперэкспрессией IL-2RA, что способствует выживанию этих клеток. Противоопухолевая активность многих химиотерапевтических агентов, таких как Адриамицин и Цисплатин, происходит из-за их способности понижать уровень экспрессии Bcl-2 [27, 132]. С другой стороны, показано, что экспрессия IL-2RA на поверхности активированных Т-лимфоцитов связана с модуляцией взаимодействия Fas/FasL, которая ответственна за апоптоз Т-лимфоцитов [35]. Наличие или отсутствие IL-2RA рецептора на Т-клетках является критическим

для его ответа на IL-2, который может действовать как фактор роста или цитокин смерти [233]. Показано, что активированные CD25+ Т-клетки устойчивы к Fas-опосредованному апоптозу. Таким образом, CD25 играет уникальную роль в регуляции Fas-опосредованного апоптоза [224].

Суммируя результаты, полученные при выполнении данного раздела работы, можно заключить, что частота обнаружения мРНК мембранной формы ICAM-1 у больных РП была статистически значимо выше, чем частота обнаружения CD54TMDel. Матричная РНК CD54TMDel встречалась только в образцах опухолей, положительных по мРНК мембранной формы. В периферической крови больных РП обнаружена только мРНК, кодирующая мембранную форму ICAM-1. Статистически значимые различия найдены в частоте встречаемости полноразмерной и делетированной форм мРНК ICAM-1 в опухолевых очагах больных РП, не имеющих метастазы. Количество мРНК ICAM-1-положительных образцов опухолевых очагов значимо увеличивалось с увеличением стадии заболевания. Матричная РНК CD54TMDel выявлялась в образцах опухолей только в отсутствие метастазов. Частота детекции мРНК ICAM-1 оказалась достоверно выше, чем частота детекции мРНК CD54TMDel как у больных с метастазами, так и у больных без метастазов. Кроме того, мРНК CD54TMDel обнаружена только на первой стадии РП. То есть обнаружение мРНК альтернативной формы ICAM-1 в опухолях почки было ассоциировано с ранней стадией развития опухоли.

В настоящее время установлено, что изменение экспрессии гена ICAM-1 способствует развитию широкого спектра онкологических заболеваний и оказывает влияние на метастазирование опухолевых клеток [159]. Показано, что, при различных заболеваниях, экспрессия ICAM-1 повышается при метастазировании и при прогрессии опухолевого процесса [105]. Клетки опухолевых очагов могут способствовать усиленной экспрессии ICAM-1 на

поверхности эндотелия близлежащих лимфатических сосудов и лимфоузлов, таким образом создавая микросреду, благоприятную для распространения опухоли [124].

В нашей работе показано, что при РП в опухолевых очагах и крови больных, частота детекции обеих делетированных форм мРНК IL-2RA (CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del) была статистически значимо ниже, чем частота детекции полноразмерной формы мРНК. Форма мРНК CD25Exo4Del статистически значимо чаще содержалась в образцах крови, чем форма, кодирующая CD25Exo4-5Del. Отсутствие метастазов сопровождалось снижением частоты обнаружения мРНК CD25 за счет повышения уровня экспрессии мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del, что оказалось статистически значимо для CD25Exo4-5Del. Выявление делетированных форм мРНК CD25 в опухолевых очагах больных РП было ассоциировано с благоприятным течением заболевания.

Молекула IL-2RA участвует в механизмах пролиферации неопластических клеток, а высокий уровень экспрессии IL-2RA на их поверхности коррелирует с плохим прогнозом для пациента. По уровню экспрессии IL-2RA в клетках при многих онкологических заболеваниях можно определить стадию опухолевого роста и наличие метастазов в лимфатические узлы [169]. В то же время, низкий уровень CD25 антигена на Т-клетках периферической крови может привести к потере лимфоцитами пролиферативной способности и ингибированию их функций [213].

В периферической крови больных мРНК CD95Exo6Del встречалась реже, чем мРНК CD95, что свидетельствует о готовности лимфоцитов периферической крови к апоптозу, опосредованному активацией, то есть, этот показатель отражает степень активации лимфоцитов периферической крови расположенных к апоптозу [147].

В образцах опухолей, наоборот, в сравнении с мРНК CD95 значительно чаще обнаруживалась мРНК CD95Exo6Del, что указывает на снижение чувствительности клеток опухолевых очагов к Fas-опосредованному апоптозу. По-видимому, отсутствие мРНК, кодирующей мембранную форму, и выявление делетированной формы CD95Exo6Del в образцах опухолей чаще, чем в крови больных, связано с нарушениями в сплайсинге пре-мРНК. Нарушения могут быть вызваны мутационным процессом как в гене APT, кодирующем Fas антиген, так и в генах, кодирующих белки сплайсосомы. В образцах опухолевых очагов, где мРНК Fas не обнаружена, ее экспрессия, вероятно, блокирована на хромосомном уровне, что можно рассматривать как механизм ухода опухолевых клеток от иммунологического контроля.

Снижение экспрессии мРНК Fas, который в норме рассматривается как супрессор опухолевого роста, зарегистрировано и при разной степени тяжести течения заболевания. Частота экспрессии полноразмерной мРНК гена Fas уменьшалась не только при метастазировании, но также на последних стадиях развития опухоли, что считается одним из механизмов, с помощью которых опухолевые клетки избегают уничтожения по пути Fas-опосредованного апоптоза. Это позволяет рассматривать Fas как показатель агрессивности опухолевого процесса. Полученные данные отражают особенности транскрипции гена Fas в клетках иммунной системы и опухолевых клетках больных раком почки.

3.2. Характеристика экспрессии гена RAGE

3.2.1. Разработка методики обнаружения вариантов мРНК гена RAGE

Среди редких генов, экспрессирующихся клетками рака почки человека, ген RAGE является одним из наиболее перспективных для использования в диагностике и иммунотерапии рака почки. Отдельным фрагментом исследования явилась оценка частоты обнаружения двух альтернативных

транскриптов гена RAGE, один из которых встречается во многих тканях (RAGE-1), а второй обнаруживается только в тестикулах и опухолевых клетках (RAGE-4) [75]. Изучение особенностей их экспрессии при онкологических заболеваниях, и в том числе при раке почки, даёт возможности для понимания их роли в канцерогенезе. С этой целью нами была разработана методика обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в крови и в неопластических клетках. Для этого с использованием пакета программ DNA.STAR был осуществлен подбор праймеров, необходимых для детекции мРНК RAGE.

При дизайне праймеров для выявления мРНК RAGE-1 и RAGE-4 использовали данные сравнительного анализа первичной структуры всех представителей мРНК гена RAGE. Нуклеотидные последовательности доступны в портале базы данных национального центра биотехнологической информации (NCBI) в разделе «nucleotide» под следующими регистрационными номерами :NMU46191 – Homo sapiens Human renal cell carcinoma antigen RAGE-1 mRNA GI: 1517896. -NMU46192 Homo sapiens Human renal cell carcinoma antigen RAGE-2 mRNA GI: 1517900. -NMU46193 Homo sapiens Human renal cell carcinoma antigen RAGE-3 mRNA GI: 1517904. -NMU46194 Homo sapiens Human renal cell carcinoma antigen RAGE-4 mRNA GI: 1517908. Ген RAGE состоит из 12 экзонов, имеющих большое сходство нуклеотидных последовательностей, содержащих открытые рамки считывания [75, 88] (Рисунок.6).

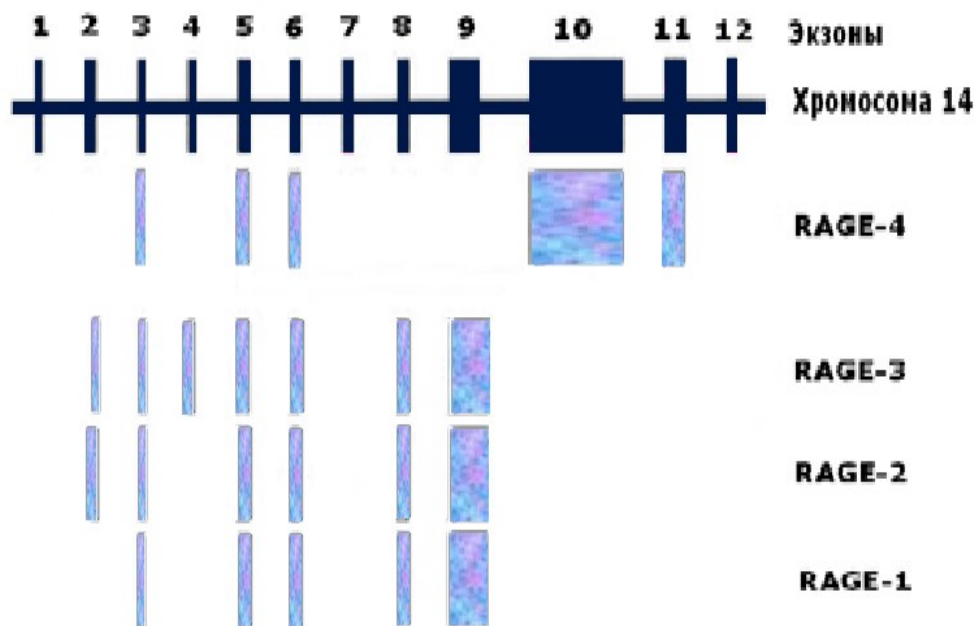


Рисунок. 6. Схематическое выравнивание последовательностей, полученных от всех четырех кДНК RAGE.

С использованием компьютерной программы MapDraw пакета DNASTAR составили карту первичной структуры мРНК RAGE и определили кодирующие области, а также участки, соответствующие границам экзонов. Полученные данные были использованы для подбора праймеров, специфичных для детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 методом ОТ-ПЦР. Первичная структура выбранных праймеров приведена в таблице 11.

Таблица 11 - Первичная структура праймеров для выявления мРНК RAGE-1 и RAGE-4

мРНК	Раунд ПЦР	Праймеры		Температура отжига °С
		название	5'- 3' последовательность	
RAGE-1	1	R1-R1	ATATTAGCCCAGAACATCC	53
		R1-F1	GAAGTGGGAATTGGAAGAAG	
	2	R1-F2	GGGAGACTGAAGGGTAGC	58
		R1-R2	AAACGGACGCAGGCGCAT	
RAGE-4	1	R4-R1	GGACTCTAGCTGCCTTGTGG	56
		R4-F1	TGGAGTAAATGAACTGGACC	

	2	R4-F2	CACACCCGCTCAGAAGATC	60
		R4-R2	CAGCAGAGGGTTGAGGATGA	

Для анализа мРНК RAGE применяли «гнездовой» вариант ПЦР, в котором были использованы две пары олигонуклеотидных праймеров. Пара внутренних праймеров ограничивала последовательность, расположенную внутри последовательности, фланкированной парой внешних праймеров (Рисунок.7). Это способствовало увеличению чувствительности и специфичности анализа.

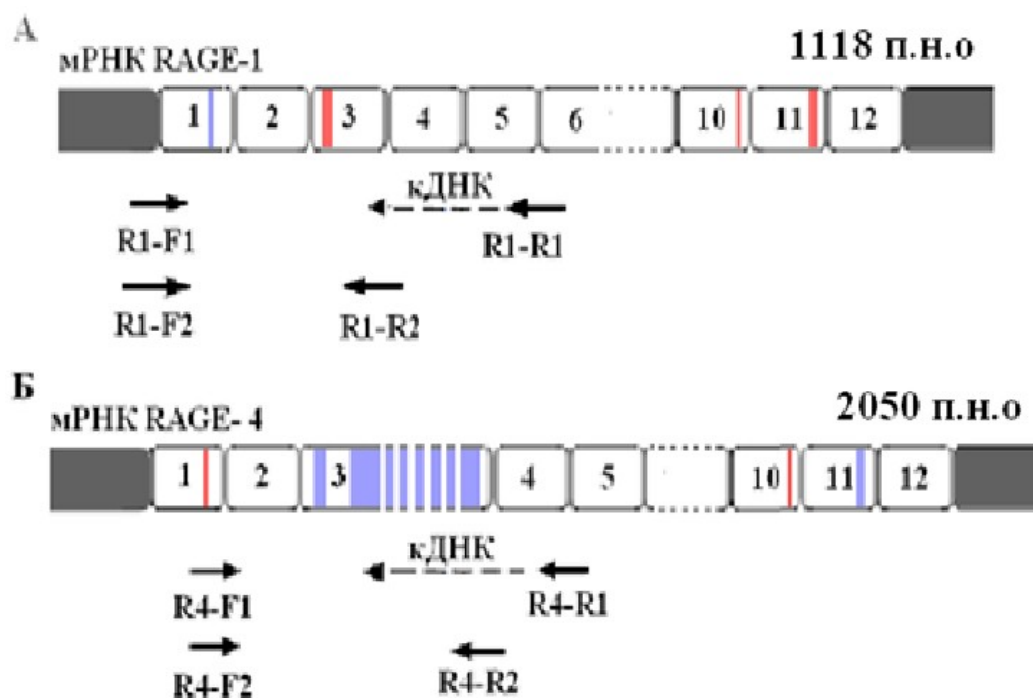


Рисунок. 7. Схема расположения праймеров для детекции мРНК RAGE-1 (А) и RAGE-4 (Б).

- Светлые боксы: экзоны; - Темные боксы: нетранслируемые регионы; - Синим цветом: вставка нуклеотидов; - красном цветом: дефицит нуклеотидов; – Цифрами: обозначены номера экзонов; - R1-F1, R1-F2, R1-R1, R1-R2, R4-F1, R4-F2, R4-R1 и R4-R2: названия праймеров.

Для проведения гнездового варианта ПЦР, праймеры были выбраны с помощью составленной ранее карты, используя программу PrimerSelect. Для RAGE-1 пара прямых праймеров – RAGE-1-F1 и RAGE-1-F2 локализовались в начале первого экзона RAGE гена (R1-F1, R1-F2). Обратные праймеры– RAGE-1-R1 и RAGE-1-R2 – локализовались в местах соединения 5 со 6 экзоном (R1-R1) и 3 с 4 экзоном (R1-R2) (Рисунок.7 А). Для мРНК RAGE-4 пара прямых праймеров RAGE-4-F1 и RAGE-4-F2 – локализовались в местах соединения 1 со 2 экзоном (R4-F1, R4-F2). Обратные праймеры RAGE-4-R1 и RAGE-4-R2 – локализовались в местах соединения 4 со 5 экзоном (R4-R1) и 3 с 4 экзоном (R4-R2) (Рисунок.7 Б).

Подобранные праймеры были испытаны в обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции для определения мРНК RAGE в образцах крови и опухолевых очагов больных раком почки. Для оптимизации условий детекции исследуемых мРНК проводили поиск оптимальной температуры отжига праймеров с использованием компьютерной программы Oligo Calculator v 10 (Россия) (Таблица.12).

Таблица 12 - Оптимизированные условия проведения ПЦР для определения альтернативных вариантов мРНК RAGE

мРНК	RAGE-1		RAGE-4	
Раунд ПЦР	I Раунд	II Раунд	I Раунд	II Раунд
Предварительная денатурация	95°C-1 мин	95°C-1 мин	95°C-5 мин	95°C-5 мин
Денатурация	95°C-30 сек	95°C-30 сек	95°C-40 сек	95°C-1 мин
Отжиг праймеров	53°C-30 сек	58°C-40 сек	56°C-45 сек	60°C-1 мин
Элонгация	72°C-45 сек	72°C-50 сек	72°C-1 мин	72°C-2 мин
Постэлонгация	72°C-5 мин	72°C-5 мин	72°C-5 мин	72°C-10 мин
Количество циклов	35	25	35	30

Поставили серию реакций ПЦР «горячий старт» с вычисленными температурами отжига исследованных праймеров находящимися в диапазоне от 52°C до 62°C, что позволило определить оптимальные температуры отжига праймеров. Полученные данные использовали в полимеразной цепной реакции при условиях, показанных на таблице 12. Полученные фрагменты в ходе ОТ-ПЦР визуализировались с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле.

Электрофореграмма фрагментов ДНК представлена на рисунке 8. Как видно из рисунка, при использовании образцов клеток опухолевого очага, синтезировались фрагменты кДНК RAGE-1 и RAGE-4, размерами 440 и 584 п.н.о. (3 и 2 соответственно).

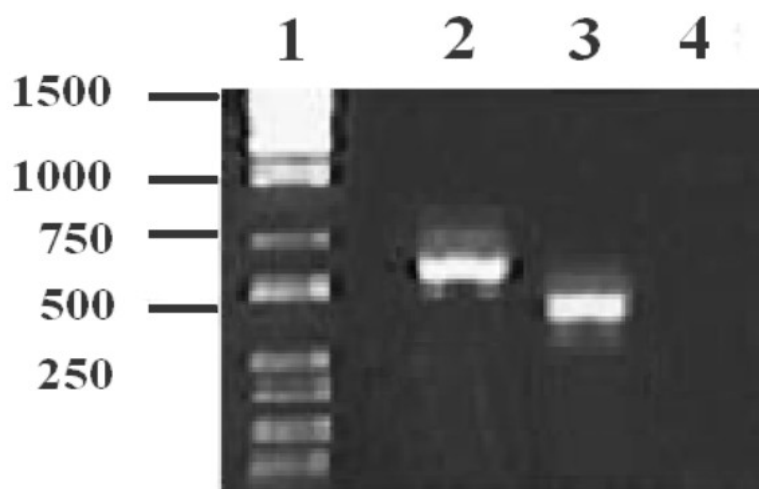


Рисунок. 8: Электрофореграмма детекции мРНК RAGE в образцах опухоли.

1 - Маркер молекулярной массы, выраженный в парах нуклеотидных оснований.
2 - кДНК RAGE-4. 3 - кДНК RAGE-1. 4 - Отрицательный контроль.

Нуклеотидные последовательности полученных фрагментов кДНК определили автоматическим секвенированием с использованием генетического анализатора и сравнили с первичными структурами мРНК RAGE-1 и мРНК RAGE-4 (NMU46191 и NMU46194 соответственно) с использованием программы MegAlign. Первичная структура наработанных в ходе исследования

кДНК полностью совпадала с мРНК RAGE-1 и RAGE-4, опубликованными в базе данных GeneBank под регистрационными номерами NMU46191 и NMU46194 соответственно. Таким образом, на основе ОТ-ПЦР была разработана методика обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 и подобраны оптимальные условия для их детекции.

3.2.2. Исследование частоты обнаружения мРНК RAGE в периферической крови и в опухолевых очагах больных раком почки

Разработанная методика детекции альтернативных вариантов мРНК гена RAGE была протестирована на образцах периферической крови здоровых доноров и образцах крови и опухолей больных раком почки. В периферической крови здоровых доноров мРНК RAGE-4 обнаружено не было ни в одном случае, а мРНК RAGE-1 выявлена у 17 из 30 больных (57%) (Рисунок.9).

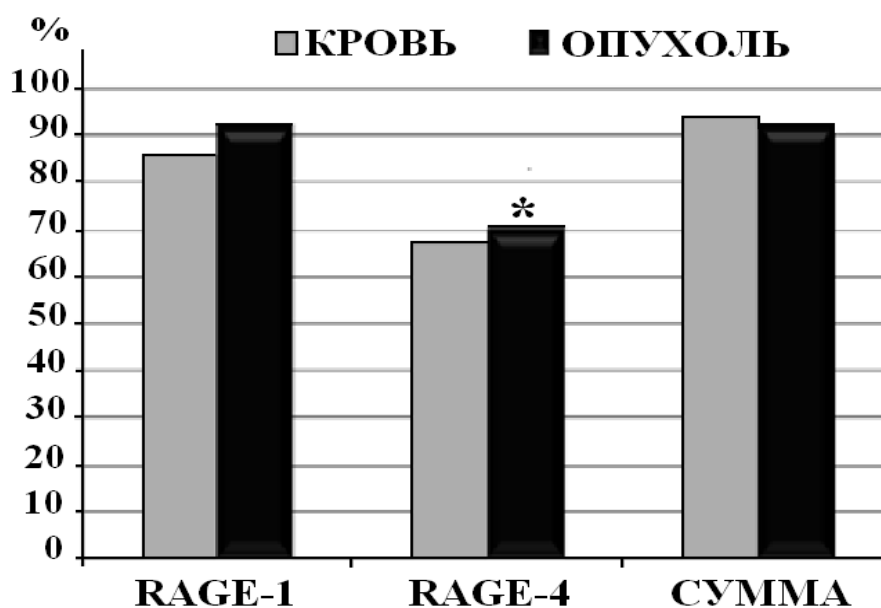


Рисунок.9 Частота выявления вариантов мРНК RAGE в крови и в опухолевых узлах больных раком почки

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления в крови мРНК RAGE-1 ($P < 0,05$).

В крови больных раком почки мРНК RAGE-4 обнаружена в 67% (25 из 37), а мРНК RAGE-1 в 86% случаев (32 из 37), что было статистически значимо выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$). В образцах опухолевых очагов мРНК RAGE-1 и RAGE-4 были выявлены в 92% (25 из 27) и 70% случаев (19 из 27) соответственно.

У больных раком почки женщин частота обнаружения мРНК RAGE-1 в опухолевых очагах была статистически значимо выше, чем частота обнаружения мРНК RAGE-4 ($P < 0,05$). Статистически достоверны различия найдены также при сравнении частоты встречаемости мРНК RAGE-4 у больных мужчин с частотой встречаемости данной мРНК у женщин ($P < 0,05$) (Таблица.13). Статистически значимых гендерных различий в частоте выявления мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в крови больных раком почки выявлено не было.

Таблица. 13 - Частота встречаемости мРНК RAGE в опухолевых узлах и крови больных раком почки разного пола (%)

Пол	Кровь		Опухоль	
	RAGE-1	RAGE-4	RAGE-1	RAGE-4
Мужской	15/18 (83)	11/18 (61)	14/15 (93)	13/15 (87)*
Женский	17/19 (89)	14/19 (74)	11/12 (92)*	6/12 (50)

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК RAGE-4 у женщин ($P < 0,05$).

Частота обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 у больных старше 53 лет (100% и 84% соответственно) была статистически значимо выше, чем частота их обнаружения у больных возрастом до 53 лет (RAGE-1 - 72% и RAGE-4 - 50% случаев) ($P < 0,05$) (Таблица.14).

Таблица.14 - Частота встречаемости мРНК RAGE генов в образцах опухоли и в периферической крови в зависимости от возраста больных раком почки (%)

Возраст	Опухоль	Кровь
---------	---------	-------

	RAGE-1	RAGE-4	RAGE-1	RAGE-4
34-53	8/10 (80)	6/10 (60)	13/18 (72)*	9/18 (50)*
54-72	17/17 (100)	13/17 (76)	19/19 (100)	16/19 (79)

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения у больных старше 53 лет ($P < 0,05$).

У 11 из 37 больных, подвергшихся удалению опухоли, были зафиксированы регионарные и отдалённые метастазы. При наличии метастазов мРНК RAGE-4 и мРНК RAGE-1 была выявлена в крови и опухолевых очагах во всех случаях (100%) (Таблица.15).

Таблица 15 - Частота обнаружения мРНК RAGE в крови и в опухолях больных раком почки при наличии или отсутствии метастазов (%)

Метастазы	опухоль		кровь	
	мРНК RAGE-1	мРНК RAGE-4	мРНК RAGE-1	мРНК RAGE-4
нет	16/18 (89)*	10/18 (55)	21/26 (81)*	14/26 (54)
есть	9/9 (100)	9/9 (100)*	11/11 (100)	11/11 (100)*

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК RAGE-4 при отсутствии метастазов ($p < 0,05$).

У пациентов без метастазов мРНК RAGE-4 выявлялась в крови и опухолях с частотой незначительно превышающей 50%. Второй вариант мРНК обнаруживался в крови и опухолях больных в полтора раза чаще.

По мере прогрессирования рака почки частота встречаемости мРНК RAGE-4 в крови и опухолевых очагах повышалась от 44-45% до 100%. Частота встречаемости мРНК RAGE-1 также нарастала от стадии к стадии. Если на первой стадии мРНК RAGE-4 обнаруживалась в крови и опухолях с частотой 78 и 82%, то на последующих стадиях - с частотой 100% (Таблица.16).

Таблица 16 - Частота обнаружения мРНК RAGE в крови и опухолевых очагах больных раком почки на разных стадиях заболевания (%)

Стадия заболевания	кровь		Опухоль	
	RAGE-1	RAGE-4	RAGE-1	RAGE-4
1 стадия	14/18 (78)*	8/18 (44)	9/11 (82)	5/11 (45)
2 стадия	7/8 (87)	6/8 (75)	7/7 (100)	5/7 (71)
3 стадия	6/6 (100)	6/6 (100)*	5/5 (100)	5/5 (100)
4 стадия	5/5 (100)	5/5 (100)*	4/4 (100)	4/4 (100)

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК RAGE-4 на первой стадии ($p < 0,05$).

Таким образом, мРНК RAGE-1 и RAGE-4 выявлялись у большей части протестированных образцов больных раком почки. Полученные результаты соответствуют данным других авторов об экспрессии мРНК RAGE при меланоме и раке головы и шеи [75, 95].

Проведена оценка характера экспрессии гена RAGE в клетках перевиваемых клеточных линий, имеющих происхождение от раковых клеток почки, включая линии A498, SN12C, ACHN и CaKi-1. Клетки всех клеточных линий экспрессировали обе формы мРНК гена RAGE за исключением клеток CaKi-1, у которых отсутствовала мРНК RAGE-1. Все протестированные клеточные линии имеют высокий метастатический потенциал и являются сильно туморогенными, кроме клеток линии CaKi-1. Последние представляют собой адгезивные клетки, которые в отличие от трех других клеточных линий экспрессируют дикую форму супрессора опухолевого роста VHL и высокие уровни ингибитора апоптоза Survivin [204]. Клетки линии CaKi-1 отличаются также высокой чувствительностью к ингибиторам пролиферации [165]. Следует отметить, что клетки линии CaKi-1, в отличие от других тестированных линий клеток, изолированы не из ткани почек, а из метастатического сайта (кожи), что может иметь отношение к отсутствию экспрессии мРНК RAGE-1.

3.2.3. Сравнение спектров экспрессии мРНК RAGE при различных злокачественных новообразованиях

С использованием разработанных методов и с целью сравнения спектров экспрессии мРНК RAGE при различных злокачественных новообразованиях был проведен анализ частоты обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в образцах опухолевых очагов и образцах крови больных раком легких, толстой кишки и раком тела матки. В достигаемых библиографических источниках данные об экспрессии мРНК RAGE в опухолях тела матки не зарегистрированы.

В наших наблюдениях частота выявления мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в крови больных РТМ составила 36% и 26%, соответственно (Таблица.17). Сходная частота детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 регистрировалась в опухолевых очагах (33% и 25% соответственно).

Таблица 17 - Частота обнаружения мРНК RAGE в крови и опухолевых очагах онкологических больных (%)

Рак	Материал	RAGE-1	RAGE-4
Рак почки	Опухоль	25/27 (92)	19/27 (70)
	Кровь	32/37 (86)	25/37 (67)
Рак тела матки	Опухоль	9/27 (33)*	7/27 (25)*
	Кровь	11/30 (36)*	8/30 (26)*
Рак легкого	Опухоль	3/30 (10)*	0/30 (0)*
	Кровь	4/25 (16)*	3/25 (12)*
Рак толстой кишки	Опухоль	7/30 (23)*	12/30 (40)
	Кровь	6/29 (21)*	7/29 (24)*

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК RAGE у больных раком почки ($p < 0,05$).

Низкая степень дифференцировки опухоли тела матки сопровождалась 100%-ной экспрессией мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в крови и опухолях. У пациенток, имеющих умеренную степень дифференцировки опухоли, мРНК

RAGE-1 встречалась в крови с частотой 66%, а мРНК RAGE-4 – с частотой 33%. Подобным образом частота детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 составила в опухолевых очагах 50% и 40%. У пациенток с высокой степенью дифференцировки мРНК RAGE-1 и мРНК RAGE-4 определялись с частотой, не превышающей 10%(Таблица.18).

Таким образом, частота обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 имела тенденцию к увеличению по мере потери степени дифференцировки опухолевых клеток. В целом присутствие мРНК RAGE было связано с низкодифференцированными опухолями, обладающими более высокой злокачественностью и худшим прогнозом.

Таблица 18 - Частота выявления мРНК RAGE в крови и в новообразованиях больных раком тела матки при разной степени дифференцировки опухоли (%)

Степень дифференцировки	Кровь		Опухоль	
	RAGE-1	RAGE-4	RAGE-1	RAGE-4
Высокая	1/13 (7)	1/13 (7)	1/12 (8)	1/12 (8)
Умеренная	6/9 (66)*	3/9 (33)	5/10 (50)*	4/10 (40)
Низкая	3/3 (100)*	3/3 (100)*	2/2 (100)*	2/2 (100)*

* – Статистически значимые различия по сравнению с пациентами, имеющими высокодифференцированную форму опухоли ($p<0,05$).

Также проведен анализ встречаемости мРНК RAGE в периферической крови и злокачественных новообразованиях больных раком толстой кишки (РТК). При исследовании образцов опухолей больных РТК, мРНК RAGE-1 была обнаружена в 23% случаев, а мРНК RAGE-4 – в 40% случаев. Сходным образом в крови мРНК RAGE-1 выявлена в 21% случаев, а мРНК RAGE-4 - в 24% случаев. Характерной особенностью мРНК RAGE-4 явилось ее наличие во всех образцах крови и клеток опухолевых очагов при низкодифференцированных новообразованиях. При

высокодифференцированных опухолях мРНК RAGE-4 в крови и опухолевых очагах отсутствовала. У больных с умеренной степенью дифференцировки опухоли мРНК RAGE-4 обнаружена в 6 из 22 образцов крови и в 9 из 24 образцов опухолей.

Частота детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 на ранних стадиях развития новообразования (1 или 2) обнаруживалась в пределах от 0 до 33%. По мере прогрессирования заболевания частота детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в крови и опухолях повышалась и достигала 100% на 4 стадии развития новообразования (Таблица. 19).

Таблица 19 - Частота обнаружения мРНК RAGE в крови и опухолевых очагах на разных стадиях рака толстой кишки (%)

Стадия заболевания	Кровь		Опухоль	
	RAGE-1	RAGE-4	RAGE-1	RAGE-4
1	0/6 (0)	1/6 (16)	0/6 (0)	2/6 (33)
2	1/14 (7)*	2/14 (14)*	1/12 (8)*	2/12 (17)*
3	3/7 (43)	2/7 (28)	3/9 (33)	5/9 (55)
4	2/2 (100)	2/2 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)

* – статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК RAGE на четвертой стадии ($p < 0,05$).

Среди 30 больных, включенных в исследование, 14 больных имели регионарные и/или дистальные метастазы к моменту резекции опухоли. При наличии метастазов частота выявления мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в крови и опухолевых очагах была в несколько раз выше, чем в отсутствии метастазов (Таблица.20).

Таблица 20 - Частота обнаружения мРНК RAGE в опухолевых очагах и крови больных раком толстой кишки при наличии или отсутствии метастазов (%)

метастазы	Опухоль		Кровь	
	RAGE-1	RAGE-4	RAGE-1	RAGE-4
есть	6/12 (50)	8/12 (67)	5/9 (56)	4/9 (44)
нет	1/18 (5)*	4/18 (22)*	1/20 (5)*	3/20 (15)
Достоверность различий	p=0.007	p=0.020	p=0.004	p>0,05

* – Статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения мРНК RAGE при наличии метастазов ($p < 0,05$).

Оценка встречаемости вариантов мРНК гена RAGE проведена также у больных раком легких (РЛ). На момент выполнения работы в доступной литературе каких-либо данных об экспрессии гена RAGE при раке легких мы не встретили. Важной особенностью его экспрессии явилось отсутствие у всех протестированных больных раком легких в опухолевых очагах мРНК RAGE-4. При этом в периферической крови больных мРНК RAGE-4 присутствовала у трех из 25 протестированных пациентов (12%) (Таблица 17). Частота встречаемости мРНК RAGE-1 в периферической крови составила 16%, а в опухолевых очагах – 10%. Ранее было показано, что ген RAGE не экспрессируется в опухолевых клетках при миеломе, остром миелоидном лейкозе и кожной Т-клеточной лимфоме [76, 185].

Присутствие метастазов у больных раком легких сопровождалось более высокой частотой детекции в периферической крови мРНК RAGE-1 и мРНК RAGE-4. Заметим, что мРНК RAGE-1 и RAGE-4 обнаруживались у 50% больных плоскоклеточным недифференцированным раком легких, но не обнаруживались ни у одного больного с другими гистологическими типами опухоли.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что в крови и опухолевых очагах больных раком почки мРНК RAGE-1 и RAGE-4 выявляются чаще, чем у больных раком тела матки, раком легких и раком толстой кишки.

Важно подчеркнуть, что при исследовании образцов, полученных от больных РП и РТК, в опухолевых очагах зарегистрирована более высокая частота встречаемости обеих мРНК RAGE, в сравнении с периферической кровью онкологических больных. В то же время при РЛ и РТМ обнаружена более высокая частота обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в периферической крови по сравнению с опухолевыми очагами.

Интересно отметить, что оба варианта мРНК RAGE встречались одновременно у всех больных, имеющих отдаленные метастазы в печень. В представленных литературных данных показано, что мРНК RAGE гиперэкспрессируется у больных карциномой печени, и что гиперэкспрессия RAGE была связана с плохим прогнозом. Гиперэкспрессия RAGE при гепатоцеллюлярной карциноме коррелирует с множественными опухолями и с прогрессией опухоли [106].

3.3. Сравнение спектров экспрессии мРНК раково-тестикулярных генов в крови и в образцах опухолей больных раком почки

Сопоставление характера экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ, с экспрессией раково-тестикулярных генов, отражающих изменения транскриптома злокачественных опухолей и кодирующих иммунодоминантные антигены, дает возможность получить дополнительную информацию о молекулярных механизмах взаимоотношений между злокачественным новообразованием и иммунным ответом на опухоль. Для сравнения спектров экспрессии мРНК раково-тестикулярных (СТ) генов в крови и опухолевых очагах больных РП были включены в исследование 22 часто экспрессирующихся в опухолях СТ гена - MAGE-A(1-6), MAGE-C1, XAGE-1a-b, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1, TRAG-3 и HAGE с последующим сопоставлением спектров и частоты их экспрессии и экспрессии мРНК ICAM-1, IL-2R α , Fas.

Результаты исследования образцов больных РП показали, что суммарная частота выявления мРНК протестированных генов в крови или опухолях составила 100%. То есть во всех образцах крови и опухолей больных раком почки содержалась хотя бы одна из исследуемых мРНК СТ генов (Таблица 21).

Таблица 21 - Частота выявления мРНК СТ генов в крови и в опухолевых очагах больных раком почки (%)

мРНК	Опухоль	Кровь
MAGE-A(1-6)	8/27 (29)*	9/37 (24)*
MAGE-C1	9/27 (33)*	6/37 (16)*
TRAG-3	12/27 (44)	18/37 (48)**
NY-ESO-1	6/27 (22)*	5/37 (13)*
XAGE-1a-b	9/27 (33)*	11/37 (29)*
HAGE	13/27 (48)	15/37 (40)**
GAGE(1-8)-PAGE-1	10/27 (37)*	10/37 (27)*
RAGE-4	19/27 (70)	25/37 (67)

Статистически значимые различия по сравнению с частотой обнаружения:

* – мРНК RAGE-4 ($p<0,05$). **– мРНК MAGE-C1 и NY-ESO-1 ($p<0,05$).

В крови больных чаще всего обнаруживалась мРНК RAGE-4 (67%), затем в порядке убывания мРНК TRAG-3 (48%), HAGE (40%), XAGE-1a-b (29%), GAGE(1-8)-PAGE-1 (27%), MAGE-A(1-6) (24%). Реже всех выявлялись мРНК MAGE-C1 и NY-ESO-1 (16% и 13% случаев соответственно). Статистически значимые различия были найдены в частоте обнаружения мРНК RAGE-4 по сравнению с частотой обнаружения мРНК MAGE-A(1-6), MAGE-C1, NY-ESO-1, XAGE-1a-b и GAGE(1-8)-PAGE-1 ($p<0,05$), а также в частоте обнаружения мРНК TRAG-3 и HAGE по сравнению с частотой обнаружения мРНК MAGE-C1 и NY-ESO-1($p<0,05$).

Как видно из Таблицы 21, мРНК исследуемых СТ генов обнаруживается в периферической крови больных РП сравнительно реже, чем в образцах опухолей. Отличительные особенности отмечены для некоторых мРНК. Так

мРНК TRAG-3 детектировалась в образцах периферической крови чаще, чем в образцах опухолей, хотя данные различия не имели достоверного характера.

Стоит отметить, что мРНК RAGE-4 и MAGE-A(1-6) встречались во всех образцах опухолевых очагов, в которых выявлялась мРНК MAGE-A(1-6). При выявлении в периферической крови мРНК NY-ESO-1 ни в одном случае не обнаруживалась мРНК HAGE. Матричная РНК RAGE-4 имела самую высокую частоту выявления как в образцах опухолей, так и образцах крови.

При сравнении частоты встречаемости мРНК раково-тестикулярных генов у больных РП, имеющих и не имеющих метастазы, были найдены статистически значимые различия. У больных с метастазами мРНК RAGE-4 и MAGE-C1, встречались в опухолевых очагах достоверно чаще, чем у больных без метастазов ($p < 0,05$) (Таблица. 22).

Также наблюдалась статистически не значимая тенденция к повышению частоты выявления мРНК MAGE-A(1-6) у больных с метастазами (44%) в сравнении с больными без метастазов (22%). Матричная РНК XAGE-1a-b, GAGE(1-8), PAGE-1 (39%), а также HAGE и TRAG-3 (61%) наоборот чаще выявлялись в опухолевых очагах при отсутствии метастазов (для TRAG-3 $p < 0,05$). Также интересен тот факт, что мРНК NY-ESO-1 не обнаружилась ни в одном из образцов опухолевых очагов рака почки при отсутствии метастазов, но в 66% случаев выявлялась у больных с метастазами.

Таблица 22 - Частота обнаружения мРНК СТ генов в образцах опухолей и в крови больных раком почки при наличии или отсутствии метастазов (%)

мРНК	Опухоль		кровь	
	Метастазы+	Метастазы-	Метастазы+	Метастазы-
MAGE-A(1-6)	4/9 (44)*	4/18 (22)	3/11 (27)*	6/26 (23)*
MAGE-C1	6/9 (67)	3/18 (17)*, **	4/11 (36)*	2/26 (8)*, **
XAGE-1a-b	2/9 (22)*	7/18 (39)	2/11 (18)*	9/26 (35)
NY-ESO-1	6/9 (66)	0/18 (0)	2/11 (18)*	3/26 (11)*
GAGE(1-8)-PAGE-1	3/9 (33)*	7/18 (39)	3/11 (27)*	7/26 (27)

TRAG-3	1/9 (11)*	11/18 (61)**,"	7/11 (64)""	11/26 (42)",""
HAGE	2/9 (22)*	11/18 (61)"	6/11 (54)*	9/26 (35)"
RAGE-4	9/9 (100)	10/18 (55)**	11/11 (100)""	14/26 (54)**

Статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления:
 * – мРНК RAGE-4. **– мРНК СТ генов при наличии метастазов. " – мРНК
 MAGE-C1. "" – мРНК NY-ESO-1.

Исследование образцов периферической крови больных РП, имеющих и не имеющих метастазы, показало, что у больных с метастазами наряду с мРНК RAGE-4 обнаруживается чаще также мРНК MAGE-C1 ($p < 0,05$). В то же время мРНК XAGE-1a-b встречается статистически значимо чаще при отсутствии метастазов. Статистически значимых различий в частоте встречаемости мРНК других раково-тестикулярных генов обнаружено не было.

В крови больных РП мРНК всех исследуемых СТ генов обнаруживались на всех стадиях РП за исключением мРНК NY-ESO-1, которая не обнаруживалась в наших наблюдениях у больных на третьей стадии опухолевого роста (Рисунок.10). На первой стадии чаще всего выявлялась мРНК RAGE-4, HAGE и TRAG-3 (44%), и значительно реже обнаруживалась мРНК MAGE-C1 в 5% ($p < 0,05$), а также NY-ESO-1 в 11% ($p < 0,05$). На второй стадии самую высокую частоту выявления имела только RAGE-4 (75%), мРНК MAGE-C1 и NY-ESO-1 были обнаружены реже всех остальных тестируемых СТ генов в 12% ($p < 0,05$). Матричная РНК RAGE-4 выявлялась на третьей стадии значительно чаще всех исследуемых СТ генов (100%) (по сравнению с MAGE-A(1-6) а также с NY-ESO-1 $p < 0,05$). Затем в 67% выявлялась TRAG-3 и HAGE ($p < 0,05$). Самую низкую частоту детекции на третьей стадии показали MAGE-A(1-6), MAGE-C1 и XAGE-1a-b (17%).

Четвертая стадия РП характеризовалась наиболее высокой частотой экспрессии мРНК большинства тестируемых СТ генов. В сравнении с первой стадией статистически значимо чаще выявлялись мРНК MAGE-C1, а также

RAGE-4 ($P < 0,05$), которая выявлялась во всех образцах крови. Однако, повышение частоты обнаружения мРНК СТ генов не было характерно для всех мРНК, так что XAGE-1a-b наоборот встречалась в 20% что было значительно реже чем частота обнаружения мРНК RAGE-4 ($p < 0,05$). Частота обнаружения мРНК HAGE-1 и TRAG-1 также имели тенденцию, хотя не значимую, к снижению в сравнении с другими стадиями заболевания.

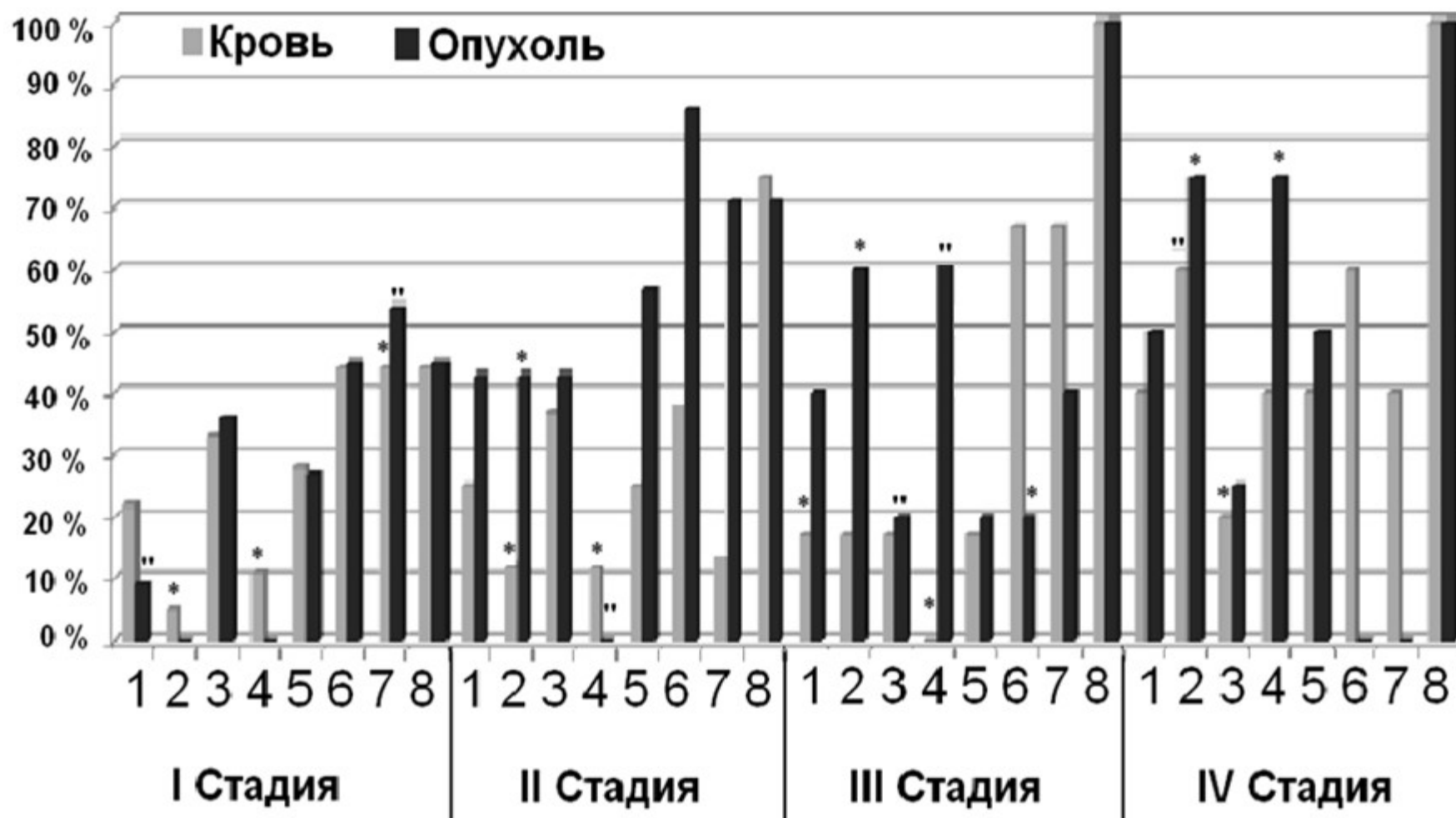


Рисунок. 10. Частота обнаружения мРНК СТ генов в образцах крови и в опухоли на разных стадиях РП
 Статистически значимые различия в частоте обнаружения ($p < 0,05$): * – мРНК СТ генов на разных стадиях рака почки. ** – разных мРНК СТ генов на каждой стадии рака почки. 1 - MAGE-A(1-6); 2 - MAGE-C1; 3 - XAGE-1a-b; 4 - NY-ESO-1; 5 - GAGE(1-8)-PAGE-1; 6 - TRAG-3; 7- HAGE; 8 - RAGE-4.

В образцах опухолевых очагов больных РП на первой стадии чаще всего встречалась мРНК HAGE (54%), что статистически значимо превышало частоту встречаемости мРНК MAGE-A(1-6) и MAGE-C1 ($p<0,05$). Матричная РНК RAGE-4 и TRAG-3 встречалась в 45%. Матричная РНК MAGE-A(1-6) встречалась реже всех остальных СТ генов (9%) (Таблица 23).

Отличительную особенность на первой стадии имела мРНК MAGE-C1, которая отсутствовала во всех взятых для исследования пробах. На второй стадии частота обнаружения мРНК TRAG-3 составила 86%, что оказалось статистически значимо выше, чем на третьей и четвертой стадиях ($p<0,05$). Матричная РНК RAGE-4 и HAGE встречалась в 71% случаев.

Таблица 23 - Частота обнаружения мРНК СТ генов в опухолевых очагах больных раком почки на разных стадиях заболевания (%)

мРНК	Стадия заболевания			
	1	2	3	4
MAGE-A(1-6)	1/11 (9)"	3/7 (43)	2/5 (40)	2/4 (50)
MAGE-C1	0/11 (0)	3/7 (43)*	3/5 (60)*	3/4 (75)*
XAGE-1a-b	4/11 (36)	3/7 (43)	1/5 (20)"	1/4 (25)
NY-ESO-1	0/11 (0)	0/7 (0)	3/5 (60)*	3/4 (75)*,"
GAGE(1-8)-PAGE-1	3/11 (27)	4/7 (57)	1/5 (20)	2/4 (50)
TRAG-3	5/11 (45)	6/7 (86)	1/5 (20)*	0/4 (0)*
HAGE	6/11 (54)"	5/7 (71)	2/5 (40)	0/4 (0)*
RAGE-4	5/11 (45)	5/7 (71)	5/5 (100)	4/4 (100)

* – Статистически значимые различия в обнаружении мРНК СТ генов на разных стадиях рака почки $p<0,05$.

" – Статистически значимые различия в обнаружении разных мРНК СТ генов на каждой стадии рака почки $p<0,05$.

Матричная РНК NY-ESO-1 отсутствовала во всех образцах опухолей на первой и второй стадиях. На третьей стадии мРНК RAGE-4 в опухолевых очагах, как и в образцах периферической крови присутствовала во всех протестированных пробах. мРНК MAGE-C1 и NY-ESO-1 обнаруживалась с частотой 60%, что было статистически значимо чаще, чем на первой и второй

стадиях ($p < 0,05$). Частота обнаружения мРНК MAGE-A(1-6) составила 40%. Реже всех на третьей стадии встречались мРНК XAGE-1a-b и TRAG-3 (20%).

Интересной особенностью клеток опухоли на четвертой стадии РП явилось отсутствие мРНК нескольких тестируемых СТ генов. Ни в одном образце не детектировалась мРНК TRAG-3 и HAGE. В работе Yao и коллег, ранее было показано, что хотя нормальные яички избыточно экспрессировали TRAG-3, злокачественные ткани яичка теряли способность его экспрессировать [242], что видимо связано со злокачественной трансформацией данного вида клеток.

Высокая частота экспрессии была характерна для мРНК MAGE-A(1-6) и GAGE(1-8)-PAGE-1, MAGE-C1 и NY-ESO-1. Кроме того, как было показано ранее, во всех исследованных образцах опухолей на четвертой стадии присутствовала матричная РНК RAGE-4.

Таким образом, частота обнаружения мРНК тестируемых СТ генов в образцах крови и в образцах опухолей достоверно различалась при наличии или отсутствии метастазов, а также на разных стадиях РП. Повышенная частота одновременно выявляемых мРНК СТ генов была связана с прогрессированием заболевания. Количество мРНК СТ-позитивных образцов опухолевых очагов было ниже, чем количество мРНК СТ-положительных образцов крови. Однако, для мРНК TRAG-3 показана высокая частота встречаемости в крови в сравнении с клетками опухолевых очагов, что можно объяснить неоднородностью опухолевых очагов, которые были использованы для получения материала для анализа. За счет поликлональности опухоли спектр экспрессии СТ генов в клетках, мигрирующих в кровь, может быть богаче спектра экспрессии СТ генов в произвольно взятом для анализа фрагменте опухоли.

Матричная РНК NY-ESO-1 и HAGE, которая не обнаруживалась в опухолевых очагах на одной стадии, выявлялась в периферической крови больных на этих же стадиях, что можно объяснить возможной потенциальной защитной ролью этих СТ генов, экспрессия которых в опухолевых клетках,

циркулирующих в крови, запускается и/или усиливается при получении сигналов от лимфоцитов в кровотоке, что может способствовать уклонению опухолевых клеток от иммунологического надзора и выживанию. Такая защита может быть не столь необходимой внутри опухолевого очага. Недавно в работе Адама и коллег, показана важная роль антигена HAGE в туморогенезе клеточных линий меланомы и установлено, что инактивация HAGE ингибирует рост и пролиферацию этих клеток. Нокдаун гена HAGE приводил к значительному снижению экспрессии белка Ras с сопутствующим снижением активации АКТ и ERK белков. Авторы заключили, что антиген HAGE необходим для роста и пролиферации опухолевых клеток меланомы путем регулирования экспрессии Ras белка, который, в свою очередь, вызывает активацию сигнальных путей, вовлеченных в пролиферацию и выживание клеток. Сделано предположение, что, таргетинг HAGE может иметь применение в терапии злокачественной меланомы и, возможно, других типов рака [25].

Частота встречаемости мРНК RAGE-4, MAGE-C1, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1 и MAGE-A(1-6) повышалась на поздних стадиях рака почки, при наличии метастазов. Вероятно, экспрессия некоторых СТ генов может защищать опухолевые клетки от апоптоза и способствовать злокачественной прогрессии. Данное предположение подтверждается в работе Nardiello и коллег, в которой показано, что продукты генов семейства MAGE-A требуются для выживания пролиферирующих клеток миеломы. Блокада экспрессии MAGE-A приводила к апоптозу опухолевых клеток, вызванному p53-зависимой экспрессией проапоптотического Bax и подавлением экспрессии белка Survivin, который связан с пролиферацией опухолевых клеток при раке почки [173, 204]. Также показано, что MAGE-C1 защищает опухолевые клетки от апоптоза, индуцированного ингибитором протеасом [80]. Кроме того, продемонстрировано, что гены MAGE-C1 и MAGE-A3 играют важную роль в защите клеток миеломы от спонтанного апоптоза, а

нокдаун этих генов приводит к индукции апоптоза злокачественных клеток миеломы и усиливает цитотоксический эффект анти-миеломных агентов [32]. Также показано, что при трансфекции опухолевых клеток различного происхождения кДНК GAGE-7, эти клетки становятся устойчивыми к апоптозу, вызванному интерфероном- γ (IFN- γ) или сигнализацией через рецептор смерти Fas/CD95. Кроме того, GAGE-7 делает клетки устойчивыми к терапевтическим агентам [57]. В недавней работе Yu Zeng с коллегами обнаружено, что нокдаун гена PAGE-4 индуцирует гибель клеток путем апоптоза. Кроме того, присутствие PAGE-4 защищало клетки от стресс-индуцированной гибели [243].

При раке почки нами установлено, что присутствие мРНК XAGE-1a-b ассоциировано с ранними стадиями развития опухоли и отсутствием метастазов. Эти данные соответствуют данным, полученным для больных раком легких. Известно, что присутствие мРНК XAGE-1 в опухолях легких ассоциировано с благоприятным прогнозом для пациента [125].

Ранее было продемонстрировано, что раково-тестикулярные гены кодируют белки, которые не только обладают иммуногенностью при злокачественных новообразованиях [79], но и модулируют иммунные реакции путем регуляции экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ [57, 183]. С целью поиска взаимоотношений между изучаемыми генами обнаруженные нами особенности экспрессии тестируемых раково-тестикулярных генов у больных раком почки были сопоставлены с картиной экспрессии генов ICAM-1, IL-2R α и Fas.

3.4. Сравнительный анализ паттернов экспрессии генов ICAM-1, IL-2R α , Fas и раково-тестикулярных генов

На этом этапе работы было проведено сравнение паттернов экспрессии генов, кодирующих дифференцировочные молекулы ICAM-1, IL-2R α и Fas, с частотой выявления СТ генов RAGE-4, MAGE-A(1-6), MAGE-C1, XAGE-1a-b, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1, TRAG-3, HAGE, RAGE-1 (Таблица.24).

При сравнении паттернов экспрессии тестируемых генов установлено, что наличие мРНК RAGE-4 в опухолевых очагах больных раком

почки сопровождалось редкой встречаемостью мРНК CD54TMDel (5% против 37% в RAGE-4-негативных образцах: $P < 0,05$). мРНК CD54TMDel отсутствовала во всех образцах, содержащих мРНК NY-ESO-1. При анализе образцов опухолевых очагов больных РП установлено, что присутствие мРНК CD54TMDel не было зарегистрировано ни в одном образце пациентов с метастазами и было ассоциировано с благоприятным течением рака почки. А наличие мРНК RAGE-4 наоборот оказалось показателем неблагоприятного течения заболевания.

В соответствии с данными, представленными в предыдущих разделах, мРНК TRAG-3 не детектируется в опухолевых очагах больных РП на 4 стадии заболевания. Сравнение частоты экспрессии мРНК TRAG-3 и мРНК тестированных генов дифференцировочных молекул показало, что мРНК CD95 обнаруживается во всех TRAG-3-позитивных образцах. Напротив, в TRAG-3-негативных образцах лишь один из двух образцов был положителен по полноразмерной мРНК Fas. Присутствие мРНК Fas наряду с мРНК TRAG-3 в опухолевых клетках, вероятно, является механизмом обеспечения чувствительности клеток опухоли к Fas-опосредованному апоптозу и указывает на возможную положительную регуляторную роль TRAG-3 в экспрессии мРНК гена Fas. Не случайно четвертая стадия РП характеризуется в каждом втором случае отсутствием в опухолевых очагах мРНК Fas на фоне одновременного отсутствия мРНК TRAG-3.

Таблица 24 - Частота обнаружения мРНК дифференцировочных генов в образцах опухолей больных раком почки, содержащих и не содержащих мРНК раково-тестикулярных генов (%)

мРНК	CD54	CD54TMDel ₁	CD25	CD25Exo4Del	CD25Exo4-5Del	CD95	CD95Exo6Del
MAGE-A(1-6)+	8/8 (100)	1/8 (12)	8/8 (100)	7/8 (87)	4/8 (50)	5/8 (63)	5/8 (62)
MAGE-A(1-6)-	16/19 (84)	3/19 (16)	16/19 (84)	14/19 (73)	11/19 (58)	15/19 (78)	11/19 (57)
MAGE-C1+	9/9 (100)	0/9 (0)	8/9 (89)	7/9 (78)	3/9 (33)	6/9 (67)	4/9 (44)
MAGE-C1-	15/18 (83)	4/18 (22)	16/18 (89)	14/18 (78)	12/18 (66)	14/18 (77)	12/18 (67)
XAGE-1a-b+	9/9 (100)	2/9 (22)	9/9 (100)	8/9 (89)	6/9 (66)	8/9 (89)	6/9 (67)
XAGE-1a-b-	15/18 (83)	2/18 (11)	15/18 (83)	13/18 (72)	9/18 (50)	12/18 (67)	10/18 (55)
NY-ESO-1+	4/6 (66)*	0/6 (0)	4/6 (66)*	2/6 (33)*	2/6 (33)	3/6 (50)	2/6 (33)
NY-ESO-1-	20/21 (96)	4/21 (19)	20/21 (96)	19/21 (90)	13/21 (62)	17/21 (80)	14/21 (67)
TRAG-3+	12/12 (100)	1/12 (8)	11/12 (92)	10/12 (83)	8/12 (67)	12/12 (100)*	8/12 (67)
TRAG-3-	12/15 (80)	3/15 (20)	13/15 (87)	11/15 (73)	7/15 (47)	8/15 (53)	8/15 (53)
HAGE+	11/13 (85)	3/13 (23)	11/13 (85)	10/13 (77)	7/13 (53)	10/13 (77)	9/13 (69)
HAGE-	13/14 (93)	1/14 (7)	13/14 (93)	11/14 (78)	8/14 (57)	9/14 (64)	7/14 (50)
RAGE-4+	19/19 (100)	1/19 (5)*	19/19 (100)	16/19 (84)	9/19 (47)	13/19 (69)	11/19 (58)
RAGE-4-	5/8 (62)	3/8 (37)	5/8 (62)	5/8 (62)	6/8 (75)	7/8 (87)	5/8 (62)
RAGE-1+	22/25 (88)	2/25 (8)*	22/25 (88)	19/25 (76)	13/25 (56)	18/25 (72)*	14/25 (56)*
RAGE-1-	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)
GAGE(1-8)-PAGE-1+	9/10 (90)	2/10 (20)	9/10 (90)	9/10 (90)	7/10 (70)	9/10 (90)	7/10 (70)
GAGE(1-8)-PAGE-1-	15/17 (88)	2/17 (11)	15/17 (88)	12/17 (70)	8/17 (47)	11/17 (68)	9/17 (52)

* – Статистически значимые различия по сравнению с частотой выявления при отсутствии мРНК раково-тестикулярного гена (p<0,05).

Транскриптом опухолевых очагов, характеризующийся отсутствием мРНК RAGE-1, статистически значимо чаще содержал мРНК альтернативной формы CD54TMDel ($p < 0,05$). Матричная РНК полноразмерных форм CD54 и CD95 также обнаруживалась чаще в образцах, не содержащих мРНК RAGE-1 ($p < 0,05$). Известно, что ингибирование экспрессии RAGE-1 малыми интерферирующими РНК (siRNA) достоверно снижало инвазивную способность клеток гепатоцеллюлярной карциномы и в то же время уменьшало активность матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9). Показано, что одновременная высокая экспрессия RAGE-1 и MMP-9 коррелирует с плохим прогнозом для пациентов. Кроме этого, siRNA-опосредованный нокдаун гена RAGE-1 в клеточных линиях карциномы печени SK-HEP1 приводил к подавлению инвазивности клеток путем воздействия на экспрессии и ферментативной активности MMP-9 [106]. Известно также, что протеолитическая активность MMP-9 приводит к сходу с мембран клеток молекул ICAM-1 и IL-2R α и подавляет пролиферативную способность Т-клеток, что указывает на роль MMP-9 и, следовательно, RAGE-1 в иммуносупрессии, инвазии опухолевых клеток, и метастазировании [83, 214].

В образцах опухолевых очагов, содержащих и не содержащих мРНК NY-ESO-1, частота обнаружения мРНК альтернативной формы IL-2R α с делецией 4 экзона различалась. В опухолевых очагах, в которых выявлена мРНК NY-ESO-1, что характерно для 3 и 4 стадий заболевания, частота обнаружения мРНК CD25Exo4Del составила 33%. В образцах, не содержащих мРНК NY-ESO-1, частота обнаружения мРНК CD25Exo4Del была почти в три раза выше и равнялась 90% ($p < 0,05$). Вероятно, встраивание функционально неактивного CD25Exo4Del в мембрану CD25-положительных клеток может приводить к блокированию связывания лиганда, и, таким образом, к снижению пролиферативной активности опухолевых клеток и функциональной активности CD25-положительных Т-регуляторов. Также следует отметить, что растворимая форма

полноразмерного CD25 антигена, сходящая с поверхности опухолевых клеток, может оказывать иммуносупрессивный эффект, конкурируя за связывание лиганда с рецепторами на поверхности клеток. В этом случае, появление растворимой формы неактивного CD25 антигена, кодируемого альтернативной формой мРНК CD25Exo4Del, может негативно воздействовать на супрессию иммунной системы и таким образом препятствовать уходу опухоли из-под надзора иммунной системы. Кроме того показано, что NY-ESO-1 является фактором неблагоприятного прогноза и ассоциирован с метастазами и запущенными формами заболевания [227]. Таким образом, наличие мРНК CD25Exo4Del в образцах опухолей больных РП можно рассматривать как показатель благоприятного течения заболевания.

Присутствие мРНК NY-ESO-1 сопровождалось и другими изменениями в спектрах экспрессии тестируемых генов. В образцах опухолевых очагов, содержащих мРНК NY-ESO-1, мРНК полноразмерных ICAM-1 и IL-2R α встречалась реже, чем в NY-ESO-1-негативных образцах (66% случаев против 96% в NY-ESO-1-негативных образцах) ($p < 0,05$). Известно, что повышенный уровень экспрессии гена ICAM-1 клетками опухолей ассоциирован с высокодифференцированными новообразованиями, а также с высокой восприимчивостью к лизису цитотоксическими Т-лимфоцитами [97, 231]. Более того, было показано, что миграция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов ингибируется снижением экспрессии молекул ICAM-1 на поверхности опухолевых клеток [238]. Также показано, что профиль экспрессии альтернативных форм мРНК IL-2R α коррелирует со степенью активации клеток иммунной системы [203, 104]. Кроме того, обнаружено, что низкий уровень экспрессии гена, кодирующего IL-2R α на клетках базального слоя эрителлия кожи у больных базальноклеточной карциномой, ассоциирован с повышенным риском рецидива [92]. Обратная картина частоты встречаемости мРНК NY-ESO-1 и мРНК ICAM-1, а также мРНК IL-2R α позволяет сделать предположение о

перспективности использования тестов на их определение в качестве дополнительных тестов мониторинга течения заболевания.

Стоит отметить, что в образцах опухолевых очагов с отсутствием полноразмерной формы мРНК ICAM-1 или IL-2R α , ни в одном образце не встречалась мРНК MAGE-A(1-6) и RAGE-4.

В образцах опухолей с отсутствием полноразмерной формы мРНК ICAM-1 также не встречалась мРНК MAGE-C1 которая отсутствовала и во всех образцах, содержащих мРНК CD54TMDel (Таблица.25).

Присутствие мРНК TRAG-3 и XAGE-1a-b, которые были ассоциированы с благоприятным течением РП, зарегистрировано только в образцах опухолей, в которых детектировалась мРНК мембранной формы ICAM-1. мРНК TRAG-3 также обнаруживалась только в образцах опухолей, положительных на мРНК Fas. Кроме того мРНК XAGE-1a-b не выявлялась ни в одном образце, с отсутствием мРНК CD25.

Также следует заметить, что высокая частота встречаемости была характерна для мРНК маркера неблагоприятного прогноза заболевания NY-ESO-1 во всех образцах опухолевых очагов, в которых не выявлялась мРНК CD25 или CD25Exo4Del. Статистически достоверных различий в частоте выявления мРНК других раково-тестикулярных генов обнаружить не удалось.

Таким образом, можно заключить, что обнаружение в опухолевых узлах делетированной мРНК CD25 без 4 экзона и делетированной мРНК ICAM-1 при РП является показателем более благоприятного течения заболевания по сравнению с опухолями, не содержащими данных укороченных форм. Делетированная мРНК ICAM-1 чаще обнаруживалась в опухолевых очагах РП, не содержащих RAGE-4, и у пациентов, не имеющих метастазов. Укороченная мРНК CD25Exo4Del чаще обнаруживалась в образцах, не содержащих маркер неблагоприятного прогноза заболевания NY-ESO-1.

Таблица 25 - Частота обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в образцах опухолей больных раком почки, содержащих и не содержащих мРНК генов иммунного ответа (%)

мРНК	MAGE-A	MAGE-C1	XAGE-1	HAGE	TRAG-3	NY-ESO-1	RAGE-1	RAGE-4	GAGE-PAGE
CD54-	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	2/3 (66)	0/3 (0)	2/3 (66)	2/3 (67)	0/30 (0)	1/3 (33)
CD54+	8/24 (33)	9/24 (38)	9/24 (38)	11/24 (46)	12/24 (50)	4/24 (16)	22/24 (95)	19/24 (79)	9/24 (38)
CD54TMDel-	7/23 (30)	9/23 (38)	7/23 (30)	10/23 (43)	11/23 (48)	6/23 (26)	23/23 (100)	18/23 (78)	8/23 (35)
CD54TMDel+	1/4 (25)	0/4 (0)	2/4 (50)	3/4 (75)	1/4 (25)	0/4 (0)	2/4 (50)	1/4 (25)	2/4 (50)
CD25-	0/3 (0)	1/3 (33)	0/3 (0)	2/3 (66)	1/3 (33)	2/3 (66)	3/3 (100)	0/3 (0)	1/3 (33)
CD25+	8/24 (33)	8/24 (33)	9/24 (38)	11/24 (46)	11/24 (46)	4/24 (16)	22/24 (92)	19/24 (79)	9/24 (38)
CD25Exo4Del -	1/6 (17)	2/6 (33)	1/6 (17)	3/6 (50)	2/6 (33)	4/6 (67)	6/6 (100)	3/6 (50)	1/6 (17)
CD25Exo4Del +	7/21 (33)	7/21 (33)	8/21 (38)	10/21 (48)	10/21 (48)	2/21(9)	19/21 (91)	16/21 (76)	9/21 (43)
CD25Exo4-5Del-	4/12 (33)	6/12 (50)	3/12 (25)	6/12 (50)	4/12 (33)	4/12 (33)	12/12 (100)	10/12 (83)	3/12 (25)
CD25Exo4-5Del+	4/15 (27)	3/15 (20)	6/15 (40)	7/15 (47)	8/15 (53)	2/15 (13)	13/15 (87)	9/15 (60)	7/15 (47)
CD95-	3/7 (42)	3/7 (43)	1/7 (14)	3/7 (42)	0/7 (0)	3/7 (42)	7/7 (100)	5/7 (85)	1/7 (14)
CD95+	5/20 (25)	6/20 (30)	8/20 (40)	10/20 (50)	12/20 (60)	3/20 (15)	18/20 (90)	13/20 (65)	9/20 (45)
CD95Exo6Del -	3/11 (27)	5/11 (45)	3/11 (27)	3/11 (27)	4/11 (36)	4/11 (36)	11/11 (100)	8/11 (73)	3/11 (27)
CD95Exo6Del +	5/16 (31)	4/16 (25)	6/16 (37)	9/16 (56)	8/16 (50)	2/16 (12)	14/16 (87)	11/16 (69)	7/16 (44)

По-видимому, образование альтернативных форм мРНК ICAM-1 с делецией в регионе, кодирующем трансмембранный регион белка, или мРНК CD25 с делецией региона, отвечающего за связывание интерлейкина-2, является компенсаторным механизмом, ограничивающим гиперэкспрессию функциональных белков ICAM-1 и CD25 на поверхности клеток. Присутствие мРНК TRAG-3 сопровождалось высокой частотой детекции мРНК Fas, приводящей к повышению чувствительности клеток опухолевых очагов к Fas-опосредованному апоптозу, что может указывать на возможную положительную регуляторную роль TRAG-3 в экспрессии мРНК Fas гена.

3.5. Сывороточное содержание растворимых дифференцировочных молекул у больных раком почки

Иммунные показатели крови являются отражением патогенетических процессов. Для оценки состояния иммунной системы пациентов с раком почки был проведён анализ сывороточного содержания растворимых молекул CD25, CD54 и CD95.

Средний сывороточный уровень (Таблица. 26) растворимых молекул ICAM-1 составил величину, равную 80 ± 52 U/ml. У здоровых волонтеров он был равен 65 ± 10 U/ml. То есть уровень растворимых молекул CD54 у больных раком почки превышал норму в 1,3 раза. Содержание растворимых молекул CD25 в сыворотке крови больных РП составило величину, равную 442 ± 23 U/ml что более, чем в 1,2 раза выше нормы (406 ± 21 U/ml). Выявлено статистически значимое повышение содержания растворимых молекул CD95 в сыворотке крови больных РП (402 ± 21 U/ml) по сравнению со здоровыми донорами крови (374 ± 23 U/ml) ($p < 0,05$). Увеличение уровня растворимого CD95 может иметь важное значение в патогенезе различных заболеваний, и привести к ускользанию опухолей от контроля иммунной системы [208].

Таблица.26 - Содержание растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови больных раком почки и здоровых доноров (U/ml)

Антиген	Норма	Рак почки
CD54	65±10	80±13
CD25	406±21	442±23
CD95	374±23	402±21*

* - Статистически значимые различия с нормой ($p<0,05$).

Сывороточный уровень изучаемых растворимых форм мембранных белков клеток иммунной системы проанализирован у больных РП на разных стадиях опухолевого процесса. Как видно из таблицы. 27, развитие опухолевого процесса сопровождается повышением от стадии к стадии сывороточного уровня растворимых молекул ICAM-1 способных связываться с лигандом LFA-1 но индуцируют торможение процессов межклеточной адгезии [13]. На первой стадии заболевания уровень растворимых молекул ICAM-1 статистически значимо превышал норму в 1,7 раза и составил величину, равную 113 ± 9 U/ml ($p<0,05$). На второй стадии сывороточный уровень растворимых молекул ICAM-1 достиг 119 ± 17 U/ml, что было достоверно выше нормы в 1,8 раза ($p<0,05$). На третьей стадии сывороточный уровень растворимого ICAM-1 превышал норму в 1,9 раза и составил величину, равную 128 ± 26 U/ml. На четвертой стадии сывороточный уровень ICAM-1 превышал норму в 2,2 раза и составил величину, равную 143 ± 39 U/ml. Таким образом, у больных раком почки, самый высокий уровень растворимых молекул ICAM-1 наблюдается на четвертой стадии.

Таблица.27 - Содержание растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови больных раком почки на разных стадиях заболевания (U/ml)

Антиген	sCD54	sCD25	sCD95
Общее содержание n=50	80±13	442±23	402±21*
Стадия 1 n = 18	113±9*	434±25	351±9
Стадия 2 n = 13	119±17*	453±16^	380±31"
Стадия 3 n = 9	128±56	489±37*	386±70
Стадия 4 n = 7	143±39	645±30^	375±11
Норма n = 50	65±10	406±21	374±23

Статистически значимые различия: * – в сравнении с нормой, " – в сравнении с I-й стадией, ^ – в сравнении с III-й стадией ($P < 0,05$).

У больных раком почки с наличием или отсутствием в опухолевых очагах полноразмерной формы мРНК ICAM-1, статистически значимых различий в сывороточном содержании растворимых молекул sCD54 не обнаружено. При этом, с выявленной в опухолевом очаге мРНК ICAM-1 сывороточное содержание растворимых молекул sCD54 равнялось 78 ± 31 U/ml. В отсутствии соответствующей мРНК в опухолевом очаге, сывороточное содержание sCD54 также осталось без изменения (Рисунок. 11).

Отсутствие в опухолевых очагах больных делетированной мРНК CD54TMDel сопровождалось повышенным в 2 раза в сравнении с нормой сывороточного уровня растворимых молекул sCD54 (134 ± 25 U/ml). При выявлении этой формы мРНК CD54TMDel в опухолевых очагах больных сывороточный уровень растворимых молекул sCD54 не отличался от нормы, составил величину, равную 69 ± 14 U/ml, и был в два раза ниже уровня у больных с отсутствием мРНК CD54TMDel в опухолевых очагах ($p < 0,05$).

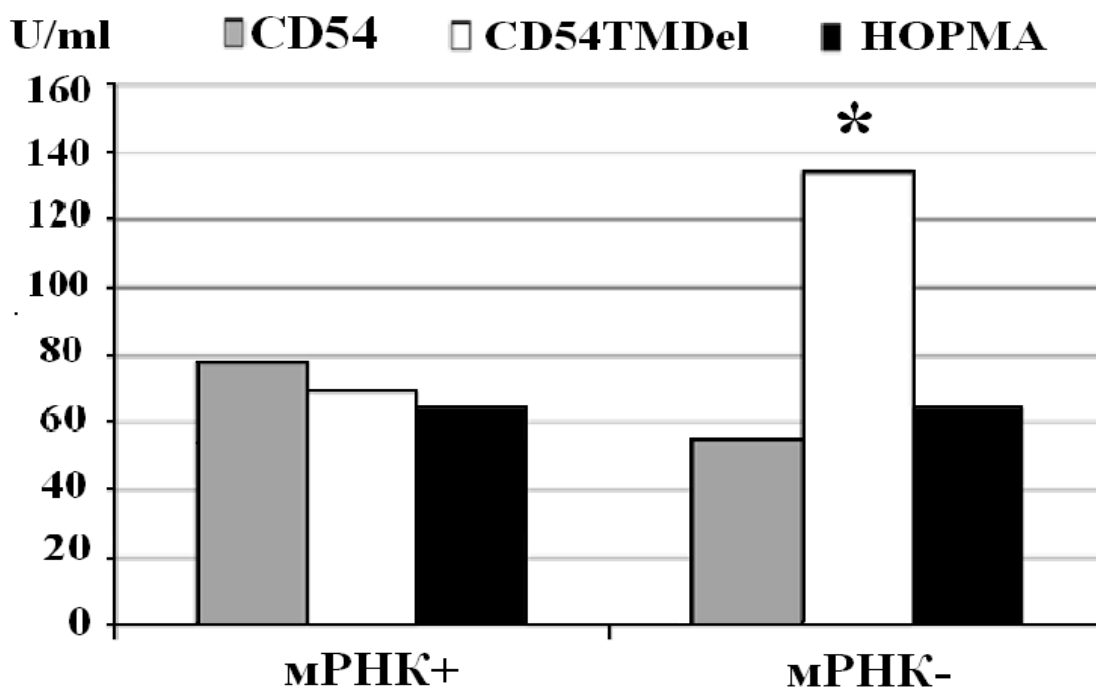


Рисунок. 11. Сывороточный уровень растворимых молекул CD54 у больных раком почки при наличии мРНК полноразмерной и делетированной форм CD54 в опухолевом очаге (мРНК+) и при их отсутствии (мРНК-).

* – Статистически значимые различия по сравнению с нормой ($p < 0,05$).
эндотелия

Известно, что продукция растворимых молекул ICAM-1 повышается после протеолитического схода с мембран клеток иммунной системы из-за активации иммунного ответа и миграции иммунокомпетентных клеток в очаги поражения [12]. Поскольку у больных РП при наличии в образцах опухоли мРНК ICAM-1 сывороточное содержание ICAM-1 не меняется, можно заключить, что растворимый ICAM-1, образующийся в результате альтернативного сплайсинга в опухолевых клетках не имеет влияния на общую концентрацию молекул ICAM-1 в периферическом кровотоке. Увеличенный уровень растворимого ICAM-1 при прогрессии стадий РП может выполнять противовоспалительную функцию путем уменьшения адгезии лейкоцитов и специфической инфильтрации лимфоцитов и моноцитов [210].

При оценке сывороточного уровня растворимых молекул CD25 обнаружено, что прогрессирование опухолевого процесса сопровождается увеличением уровня растворимого CD25. При этом на отдельных стадиях рака почки выявлены статистически значимые различия с нормой средних уровней растворимых молекул CD25. На первой стадии содержание растворимых молекул CD25 соответствовало норме. На второй стадии сывороточный уровень превышал норму в 1,2 раза и составил величину, равную 453 ± 16 U/ml. На третьей стадии сывороточный уровень растворимых молекул CD25 достоверно превышал норму в 1,3 раза и равнялся 489 ± 37 U/ml ($p < 0,05$). На четвертой стадии сывороточный уровень растворимых молекул CD25 превышал норму в 1,6 раза и составил величину, равную 645 ± 3 U/ml. У пациентов, имеющих вторую стадию рака почки, этот показатель был меньше, чем у пациентов, имеющих третью стадию ($p < 0,05$). На третьей стадии сывороточный уровень растворимых молекул CD25 был меньше, чем на четвертой стадии ($p < 0,05$).

Проведено сравнение сывороточного уровня растворимых молекул CD25 у больных РП, имеющих и не имеющих мРНК полноразмерной и делетированных форм CD25 в опухолевых очагах. Обнаружено, что у больных с выявленной в опухолевых очагах полноразмерной формой мРНК CD25, сывороточное содержание растворимых молекул CD25 равнялось 441 ± 29 U/ml (Рисунок. 12). Отсутствие соответствующей мРНК сопровождалось тенденцией к уменьшению сывороточного уровня растворимых молекул CD25 (330 ± 49 U/ml). Это указывает на то, что особенности экспрессии гена IL-2RA в опухолевых очагах не отражаются на сывороточном содержании растворимых молекул CD25, которые, как известно, являются продуктом посттрансляционной модификации белка и образуются путем протеолитического расщепления мембранной формы [12].

■ CD25 □ CD25Exo4Del ▨ CD25Exo4-5Del ■ НОРМА

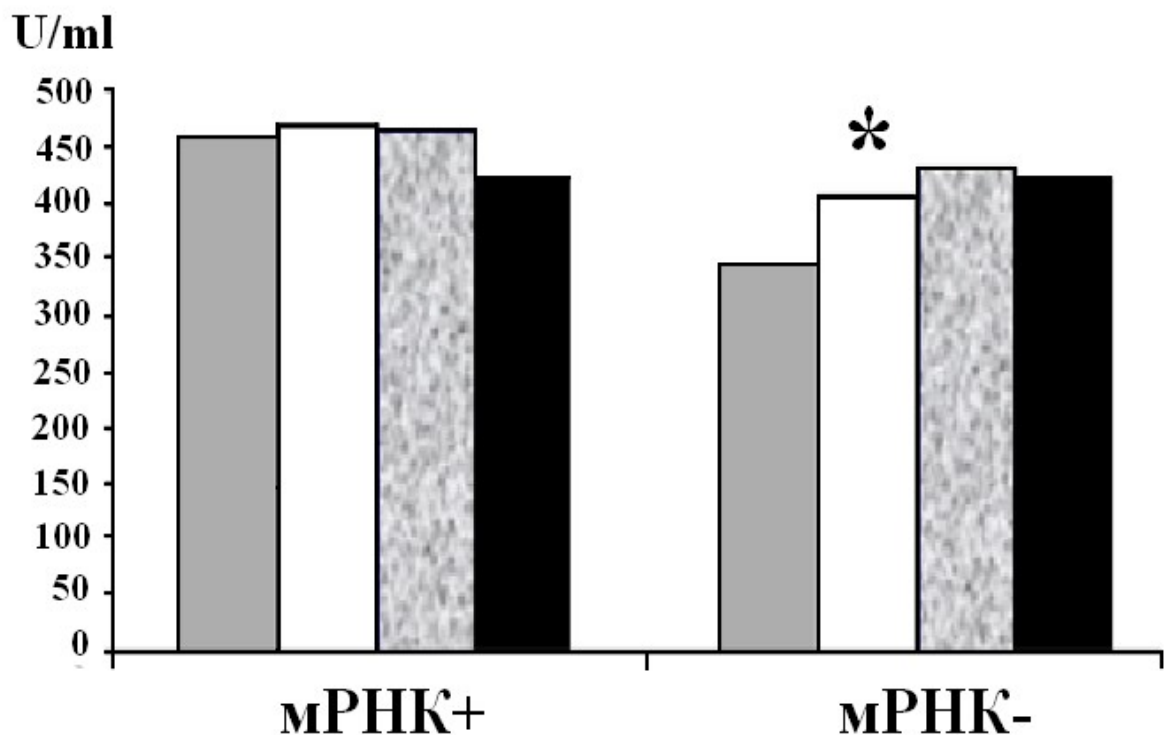


Рисунок. 12. Сывороточный уровень растворимых молекул CD25 у больных раком почки при наличии мРНК полноразмерной и делетированных форм CD25 в опухолевом очаге (мРНК+) и при их отсутствии (мРНК-).

* – Статистически значимые различия по сравнению с уровнем sCD25 при наличии мРНК CD25Exo4Del в опухолевом очаге ($p < 0,05$).

Наличие мРНК CD25Exo4Del в опухолевых очагах сопровождалось статистически достоверным изменением сывороточного уровня растворимых молекул CD25 (452 ± 33 U/ml против 390 ± 48 U/ml) при отсутствии этого варианта мРНК ($p < 0,05$), что указывает на возможную регуляторную роль этого варианта мРНК.

При наличии в опухолевых очагах сплайсингового варианта мРНК IL-2R α без 4 и 5 экзонов сывороточное содержание растворимых молекул CD25 равнялось 451 ± 53 U/ml. При отсутствии мРНК CD25Exo4-5Del оно было равно 419 ± 31 U/ml. Различия были статистически недостоверны.

В целом, полученные результаты позволяют предположить, что повышенный уровень растворимых молекул CD25 у больных РП связан с наличием в опухолевых очагах делетированных форм мРНК IL-2RA.

Гиперпродукция растворимой формы CD25, как и гиперэкспрессия мРНК IL-2R α , характерна для поздних стадий развития РП, как и других онкологических заболеваний, и коррелируют с возрастанием агрессивности опухоли и устойчивости к лекарственным препаратам [132]. Исследования *in vitro* показали, что растворимый CD25 антиген в определенной концентрации может нейтрализовать IL-2-зависимые функции иммунной системы, конкурируя за циркулирующий IL-2 с мембранной формой [191]. Также показано, что профиль экспрессии альтернативных форм мРНК IL-2R α коррелирует со степенью активации клеток иммунной системы [203, 104]. В наших наблюдениях повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD25 у больных РП зарегистрировано при прогрессии опухолевого процесса и было связано с наличием мРНК CD25Exo4Del в опухолевых очагах, что позволяет предполагать выполнение этой делетированной формы мРНК регулирующие иммунного ответа функции. Экспрессия на поверхности активированных лимфоцитов альтернативных форм IL-2RA гена, не способных связывать IL-2, предположительно является механизмом иммунной супрессии. Возможно, данные формы белка также подвергаются протеолитическому шеддингу и таким

образом участвуют в регуляции иммунного ответа. Растворимые продукты опухолей почки могут подавлять Т-клеточный ответ, блокируя как продукцию IL-2, так и сигнализацию через мембранные рецепторы IL-2 [190].

Важная роль в механизмах иммунного ответа принадлежит CD95 антигену. Через него реализуется один из путей передачи апоптотического сигнала в клетку. Растворимая форма CD95 антигена, напротив, служит ингибитором апоптоза [43]. Сывороточный уровень растворимых молекул CD95 на разных стадиях рака почки отличался от нормы и имел тенденцию к повышению от первой к четвертой стадии. На первой стадии содержание растворимых молекул CD95 составило величину, равную 351 ± 19 U/ml. На второй стадии их содержание статистически значимо отличалось от содержания на первой стадии (380 ± 31 U/ml) ($p < 0,05$), в то время как содержание растворимых молекул CD95 на третьей и четвертой стадиях имело тенденцию к повышению.

Наличие полноразмерной или альтернативной форм мРНК CD95 в опухолевом очаге больных РП не имело определяющего влияния на общую концентрацию молекул sCD95 в периферическом кровотоке, поскольку не сопровождалось статистически значимыми различиями в сывороточном уровне растворимых молекул CD95 (Рисунок. 13).

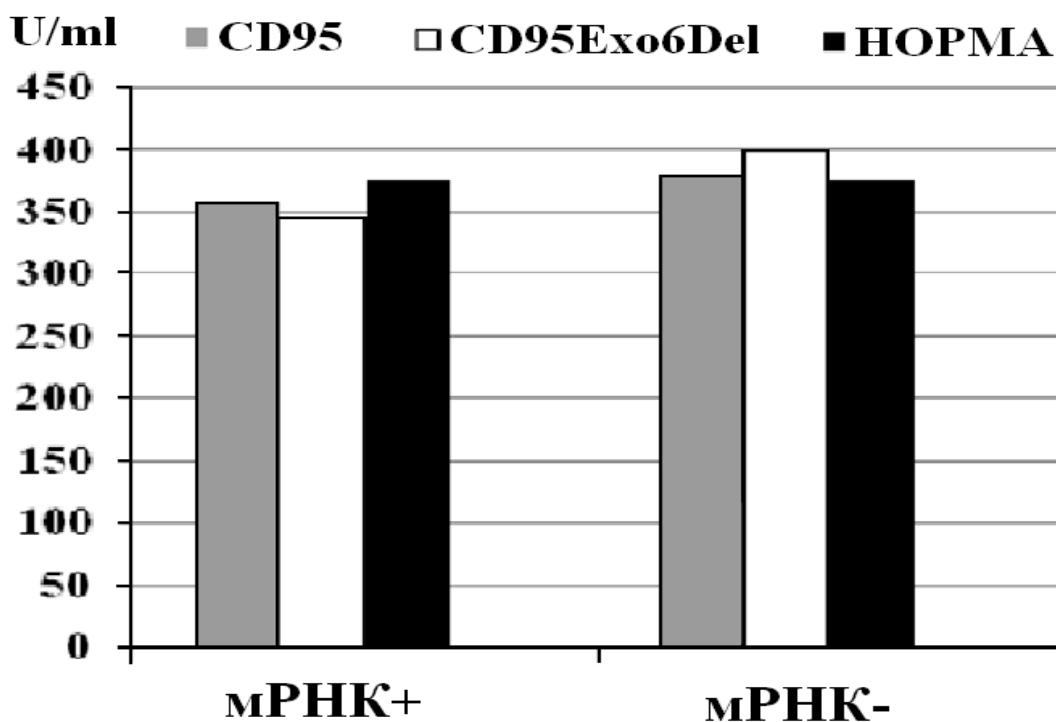


Рисунок. 13. Сывороточный уровень растворимых молекул CD95 у больных раком почки при наличии мРНК полноразмерной и делетированной форм CD95 в опухолевом очаге (мРНК+) и при их отсутствии (мРНК-).

Таким образом, уровень сывороточного CD95, по-видимому, не связан с частотой встречаемости мРНК в опухолевых очагах, и может быть обусловлен особенностями иммунного ответа и инвазивного потенциала.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хорошо известно, что трансформация нормальной клетки в опухолевую не слушается моментально так как опухоль проходит определенные стадии развития в результате генетических и эпигенетических событий, которые благоприятствуют усилению злокачественного потенциала клетки и её трансформации в доброкачественную, потом в злокачественную опухоль.

В результате этих процессов многие опухолевые клетки продуцируют антигены, которые могут высвобождаться в кровяное русло или оставаться на поверхности клеток. Такие антигены являются измененными компонентами опухолевых клеток (по структуре или экспрессии) относительно здоровых [4]. Антигены идентифицированы для большинства злокачественных новообразований человека, включая рак почки. Ключевая роль иммунной системы состоит в распознавании опухолевых антигенов, что дает возможность в последующем определить цель для эрадикации.

Для опухолевых клеток описан феномен контратаки, убивающий инфильтрирующие опухолевый очаг лимфоциты или оказывающий иммуносупрессорный эффект [246]. Данный эффект может достигаться как за счет активации или инактивации генов, так и на уровне альтернативного сплайсинга пре-мРНК генов, кодирующих дифференцировочные молекулы, важные для реализации иммунного ответа. К таким молекулам относятся молекула адгезии ICAM-1 (CD54), альфа-цепь рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α /CD25) и молекула, опосредующая апоптоз Fas (CD95). Вовлечение молекул ICAM-1, IL-2R α и Fas в процессы опухолевого роста позволяет предполагать

возможность их использования в качестве прогностических маркеров при развитии неопластического процесса.

Одним из объяснений нераспознавания антигенсодержащих опухолевых клеток Т-лимфоцитами является недостаточная экспрессия молекул адгезии, в частности ICAM-1, LFA-1 [5]. Экспрессия ICAM-1 коррелирует с инфильтрацией лимфоцитов в очаги воспаления. Умеренная экспрессия ICAM-1 значительна при локализации и уничтожении воспалительных процессов, а ещё для цитолиза вирус-инфицированных и опухолевых клеток [162, 195]. Считается, что индукция ICAM-1 благоприятствует восстановлению иммунного надзора [236].

В образцах крови больных РП нами была обнаружена только мРНК, кодирующая мембранную форму ICAM-1, в то время как в образцах опухолей найдены мРНК мембранной формы ICAM-1 и растворимой формы, кодирующей белок без трансмембранного домена (CD54TMDel). Обнаружены достоверные различия в частоте их встречаемости. Подобные различия наблюдались и при сравнении частоты выявления данных мРНК у больных с метастазами и без метастазов ($p < 0,05$). При этом мРНК CD54TMDel встречалась только в образцах опухолей с присутствующей мРНК мембранной формы, и выявлялась в опухолевых узлах в отсутствие метастазов и только на первой стадии РП. Можно предполагать, что обнаружение делетированной формы мРНК ICAM-1 в опухолях почки свидетельствует о благоприятном течении заболевания. По всем видимостям, продукция делетированной формы ICAM-1 опухолевыми клетками может мешать связыванию с лигандами её мембранного аналога, что ведёт к блокаде сигнальных путей ответственных за пролиферацию, подавление апоптоза и инвазивную способность опухолевых клеток [240, 55]. Продукт трансляции делетированной формы мРНК ICAM-1 (растворимый белок CD54) может вполне оказаться стимулятором противоопухолевого иммунитета.

Патогенетическая значимость экспрессии молекулы активации IL-2R α показана при различных заболеваниях [36, 196]. Нами обнаружено, что при РП в опухолевых очагах и периферической крови больных обнаруживается не только полноразмерная форма мРНК IL-2R α но и две делетированные формы - форма мРНК с делецией четвертого экзона, ответственного за связывание IL-2 (CD25Exo4Del) и вариант без экзонов 4 и 5 (CD25Exo4-5Del). Частота детекции обеих делетированных форм была статистически значимо ниже, чем частота

детекции полноразмерной формы мРНК и ниже чем у здоровых лиц ($p < 0,05$). Форма мРНК CD25Exo4Del чаще встречалась чем форма, кодирующая CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$). Альтернативные формы CD25 в опухолевых очагах выявлялись у пациентов при благоприятном течении заболевания. Более низкая, чем у здоровых волонтеров, частота определения мРНК делетированных форм в крови больных РП, может свидетельствовать о нарушении иммунологических реакций в организме больного. Возможно, это отражает механизмы регуляции опухолевого роста, в которые вовлечены как полноразмерная мРНК CD25, так и укороченные формы, кодирующие неактивные белки.

У больных РП отсутствие метастазов сопровождалось снижением частоты обнаружения мРНК CD25 за счет повышения уровня экспрессии мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del, что оказалось статистически значимо для мРНК CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$). Делетированные формы мРНК CD25 в опухолевых очагах больных РП выявлялись при благоприятном течении заболевания. Встраивание функционально неактивных мРНК CD25Exo4Del и CD25Exo4-5Del в мембранный рецептор интерлейкина-2 может приводить к блокированию механизма связывания лиганда, и, таким образом, к снижению пролиферативной активности опухолевой клетки. В крови больных РП делетированные формы мРНК CD25 встречались чаще на поздних стадиях развития заболевания, чем на ранних. Также при метастазировании и при прогрессии заболевания в крови больных наблюдались достоверные различия в частоте обнаружения делетированных форм мРНК CD25 по сравнению с полноразмерной формой. В опухолевых очагах, наоборот, при наличии метастазов частота встречаемости мРНК CD25Exo4-5Del была статистически значимо ниже встречаемости полноразмерной мРНК CD25 в отличие от больных без метастазов. Кроме того, больные на 3 и 4 стадии также характеризовались статистически значимыми различиями в частоте встречаемости данных форм мРНК CD25. То есть низкая частота обнаружения мРНК CD25Exo4-5Del в опухолевых очагах ассоциирована с более тяжелым течением опухолевого процесса. Хорошо известно, что в состав

опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов входят Т-регуляторы, несущие на своей поверхности в большом количестве молекулы CD25. Возможно, что смещение равновесия между синтезом альтернативных форм мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 в сторону полноразмерной мРНК является одним из звеньев механизма иммуносупрессии, приводящего к прогрессированию опухолевого роста.

Антиген Fas (CD95) принимает участие в инициации апоптоза разных типов клеток. Его мембранная и растворимая формы модулируют апоптотические процессы [187]. У больных РП нами обнаружено, что частота встречаемости мРНК CD95 в крови выше, чем мРНК CD95Exo6Del. Это свидетельствует о готовности лимфоцитов периферической крови к апоптозу, опосредованному активацией, что отражает степень активации лимфоцитов крови. В образцах крови тоже наблюдалось снижение экспрессии делетированной мРНК CD95 от стадии к стадии и при наличии метастазов, хотя данные различия не имели достоверного характера. На первой стадии частота детекции делетированной мРНК CD95 была статистически значимо ниже, чем частота детекции полноразмерной формы мРНК ($P < 0,05$). Отсутствие мРНК, кодирующей мембранную форму, и выявление укороченной формы CD95Exo6Del в образцах опухолей наблюдалось чаще, чем в крови больных. Снижение экспрессии мРНК Fas, который в норме рассматривается как супрессор опухолевого роста, зарегистрировано и при разной степени тяжести течения РП. Частота экспрессии мРНК Fas значительно уменьшается при метастазировании, на поздних стадиях заболевания, что считается одним из механизмов, с помощью которых опухолевые клетки избегают уничтожения по пути Fas-опосредованного апоптоза. Это позволяет рассматривать наличие мРНК Fas на клетках опухоли как показатель агрессивности опухолевого процесса.

Таким образом, нами в периферической крови больных РП, а также в опухолевых очагах выявлены различия в спектрах мРНК, кодирующих полноразмерные и делетированные формы дифференцировочных молекул ICAM-1 (CD54), IL-2R α (CD25) и Fas (CD95), что отражает особенности

транскриптома клеток, циркулирующих в кровь, а также опухолевых очагов больных РП. Выявление взаимоотношений между изменениями в спектре альтернативных форм мРНК генов, вовлеченных в иммунный ответ, позволяет предположить, что характер и уровень экспрессии каждой формы мРНК может оказывать влияние на процессы, связанные с миграцией, адгезией, пролиферацией и инициацией апоптоза.

При сравнении частот обнаружения мРНК дифференцировочных генов и их альтернативных форм в опухолевых очагах больных РП были найдены статистически достоверны различия. Так, мРНК CD25Exo4-5Del обнаруживалась достоверно чаще в опухолевых очагах, содержащих CD54TMDel и CD95Exo6Del ($p < 0,05$). Матричная РНК CD95Exo6Del также встречалась в опухолевых очагах, содержащих CD54TMDel, значительно чаще. В образцах опухолей больных РП, содержащих мРНК CD54TMDel или CD25Exo4-5Del, мРНК CD95 встречалась статистически значимо чаще ($p < 0,05$).

Известно, что во многих случаях антитела, направленные против ICAM-1 и IL-2RA, имеют сходные функциональные эффекты. Кроме того, взаимодействие ICAM-1 с LFA-1 может индуцировать продукцию IL-2R α . Добавление IL-2 к клеткам, экспрессирующим ICAM-1 и IL-2R α , приводит к даун-регуляции экспрессии ICAM-1 [41]. В свою очередь, ICAM-1, связываясь с LFA-1, может генерировать стимулирующий сигнал, способствующий продукции IL-2, что поддерживает пролиферацию клеток. Наличие IL-2R α на мембране опухолевых клеток, а также IL-2-зависимая модуляция экспрессии ICAM-1 могут влиять на иммунные реакции [65].

Онкологический процесс сопровождается кардинальным изменением в транскриптоме клеток, вовлекающим активацию работы молчащих генов, в норме характерных для гаметогенных и эмбриональных клеток. Предполагается, что up-регуляция эпигенетически молчащих опухолевых генов может индуцировать противоопухолевый иммунный ответ и способствовать их клинической активности [94, 234]. Одними из наиболее важных и хорошо изученных групп таких генов являются раково-тестикулярные гены. Они обычно

экспрессируются в зародышевых клетках, но также активны в различных типах опухолей и часто кодируют антигены, которые являются иммуногенными у больных опухолями. Эти свойства раково-тестикулярных генов определяют потенциальную возможность для их использования в качестве биомаркеров для раннего обнаружения злокачественных новообразований и в качестве мишеней для иммунотерапии.

С целью сравнительного анализа экспрессии генов иммунного ответа и опухоль-ассоциированных генов проведен анализ частоты встречаемости в крови и опухолевых очагах матричной РНК 22 наименований раково-тестикулярных генов (СТ генов) с последующим сопоставлением спектров и частоты экспрессии мРНК ICAM-1, IL-2R, Fas и мРНК СТ генов. Известно, что индукция экспрессии раково-тестикулярных генов (Cancer Testis genes - СТ генов) в неопластических клетках является одним из признаков приобретения опухолевыми клетками таких свойств как иммортализация, инвазия и метастазирование [91, 199]. Обнаружение мРНК раково-тестикулярных генов в периферической крови свидетельствует о наличии в кровяном русле метастазирующих клеток [121, 189]. Экспрессия раково-тестикулярных генов не является опухолеспецифичной. Однако известен ген, который с высокой частотой обнаруживается при раке почки, в связи с чем его называли RAGE. Отдельным предварительным фрагментом исследования явилась оценка частоты обнаружения двух альтернативных транскриптов гена RAGE, один из которых встречается во многих тканях (RAGE-1), а второй обнаруживается только в тестикулах и опухолевых клетках (RAGE-4). Были разработаны методы определения альтернативных вариантов мРНК гена RAGE: RAGE-1 и RAGE-4.

Суммируя полученные нами результаты, можно заключить, что впервые продемонстрировано присутствие альтернативных вариантов мРНК гена RAGE в опухолевых очагах и периферической крови больных раком тела матки и раком легких. При различных формах злокачественных новообразований представлены данные о частоте выявления вариантов мРНК RAGE в крови и в опухолевых очагах больных с разными гистологическими формами, на разных стадиях

заболевания, при разной локализации опухоли, при метастазах и в зависимости от пола и возраста больного. Кроме того, мРНК RAGE-1 и RAGE-4 обнаруживалась в клетках линий A498, SN12C и ACHN, имеющих происхождение от клеток рака почки.

При раке почки мРНК RAGE-1 и RAGE-4 выявлялись в большей части протестированных образцов. Данные свидетельствуют о более высокой частоте встречаемости этих мРНК в образцах опухолевых очагов, чем в образцах крови. Матричная РНК RAGE-1 выявлялась чаще, чем мРНК RAGE-4 как в образцах крови, так и в образцах опухолей, где различия во встречаемости мРНК RAGE-1 по сравнению с мРНК RAGE-4 были статистически достоверны. Литературные данные, касающиеся экспрессии мРНК RAGE, указывают, что у больных меланомой и раком головы и шеи RAGE-1-положительные опухоли были наиболее распространенными [75, 95].

Различия были найдены в частоте обнаружения данных мРНК в образцах опухолей у больных женщин и мужчин, а также в образцах пациентов старше и младше 53 лет. Кроме того, частота обнаружения мРНК RAGE в образцах опухолей больных с метастазами отличалась от частоты обнаружения данных мРНК у больных без метастазов. То есть наличие метастазов сопровождается достоверным повышением частоты детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в образцах крови и образцах опухолей больных РП ($p < 0,05$). Более того, прогрессия РП сопровождается достоверными различиями в частоте встречаемости обеих мРНК RAGE от стадии к стадии ($p < 0,05$).

Изменения в экспрессии мРНК RAGE-1 и RAGE-4 могут быть обусловлены различиями в их строении, и в особенностях регуляции их экспрессии. Учитывая, что у больных меланомой и раком печени гиперэкспрессия RAGE связана с более тяжелыми формами опухоли [75, 106], можно предположить, что повышение частоты экспрессии исследуемых вариантов мРНК RAGE на поздних стадиях рака почки может способствовать метастатическим и агрессивным фенотипам рака почки.

Сравнение спектров экспрессии мРНК RAGE при раке почки и других формах злокачественной неоплазии позволило установить следующее. При раке тела матки частота выявления мРНК RAGE-1 и RAGE-4 была значимо ниже, чем при раке почки ($p < 0,05$). Частота выявления мРНК RAGE-1 у больных с высокодифференцированным раком тела матки была статистически значимо ниже, чем частота обнаружения данной мРНК у пациенток с низкой и умеренной степенями дифференцировки опухоли ($p < 0,05$). Для мРНК RAGE-4 подобные различия наблюдались только между группами пациенток, имеющих высокодифференцированную опухоль и опухоль с низкой степенью дифференцировки ($p < 0,05$), то есть присутствие мРНК RAGE при раке тела матки было связано с низкодифференцированными опухолями, обладающими более высокой злокачественностью и худшим прогнозом.

У больных раком толстой кишки мРНК RAGE-4 выявлялась чаще, чем мРНК RAGE-1 и чаще, чем у больных раком тела матки. Сравнение встречаемости мРНК RAGE в крови и в образцах опухолей больных на разных стадиях заболевания позволило выявить, что имела тенденция к повышению частоты обнаружения мРНК RAGE-1 и RAGE-4 от первой к четвертой стадии, но статистически значимыми были различия между второй и четвертой стадией рака толстой кишки ($p < 0,05$). Наличие метастазов также сопровождалось достоверным повышением частоты обнаружения обеих мРНК RAGE и в крови и в образцах опухолей ($p < 0,05$). Статистически значимых различий в частоте встречаемости мРНК RAGE-1 и RAGE-4 при разной степени дифференцировки не найдено, что, возможно, было связано с малым числом наблюдений. Однако, если мРНК RAGE-4 была выявлена у всех больных с низкодифференцированными опухолями толстой кишки, то у больных, имеющих умеренную степень дифференцировки опухоли, она определялась намного реже, а при высокой степени дифференцировки не было обнаружено ни одной из мРНК RAGE. При разной локализации опухоли толстой кишки различий в частоте встречаемости мРНК RAGE не обнаружено.

По сравнению с другими формами рака у больных раком легких мРНК RAGE обнаруживалась значительно реже и в крови и в образцах опухолей. При этом мРНК RAGE-4 отсутствовала во всех образцах клеток опухолевых очагов. Вместе с тем при наличии метастазов в крови и опухолях всегда обнаруживалась хотя бы одна из мРНК RAGE. Наличие отдалённых метастазов сопровождалось статистически значимым повышением частоты обнаружения мРНК RAGE-4 в крови по сравнению с частотой ее обнаружения в отсутствии метастазов ($p < 0,05$). Экспрессия мРНК RAGE у больных раком легких также была связана с плоскоклеточными опухолями. Ни у одного больного с другими гистологическими типами опухоли не обнаруживалась мРНК RAGE ни в крови, ни в образцах опухолей.

Установлено, что у больных раком почки и раком толстой кишки обе мРНК RAGE встречались чаще в образцах опухолевых очагов, чем в образцах крови, в то время как у больных раком легких или тела матки, наоборот, исследованные мРНК чаще обнаруживались в образцах периферической крови. В периферической крови и в опухолевых очагах у всех больных раком почки, легких и тела матки мРНК RAGE-1 экспрессировалась чаще, чем мРНК RAGE-4. При раке толстой кишки мРНК RAGE-4 встречалась чаще и в крови и в образцах опухолей ($p < 0,05$).

Обращает на себя внимание сравнительно редкая встречаемость мРНК RAGE при раке легких. Ранее была продемонстрирована связь частоты экспрессии мРНК RAGE с локализацией опухоли при раке головы и шеи: мРНК RAGE-1 была обнаружена преимущественно в гортани, мРНК RAGE-4 в гортаноглотке, обе мРНК RAGE редко обнаруживались в ротоглотке. Это наблюдение указывает на различные механизмы сплайсинга, дающие в разных тканях разные варианты мРНК, являющиеся продуктом одного и того же гена [95].

Необходимо отметить, что обе мРНК RAGE встречались одновременно у всех больных различными формами опухолей, имеющих отдаленные метастазы в печени. Ранее показано, что мРНК RAGE гиперэкспрессируется у больных

карциномой печени, и что гиперэкспрессия RAGE связана с плохим прогнозом для больных раком печени [106].

На следующем этапе работы перечень наименований тестируемых мРНК раково-тестикулярных генов был дополнен мРНК генов MAGE-A(1-6), MAGE-C1, XAGE-1a-b, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1, TRAG-3 и HAGE. Суммарная частота выявления мРНК протестированных генов в крови или опухолях составила 100%, то есть во всех образцах крови и опухолей содержалась хотя бы одна из исследуемых мРНК. Заметим, что в крови 30 здоровых доноров ни в одном случае мРНК СТ генов не детектировалась. Обнаружено, что частота выявления мРНК исследуемых СТ генов достоверно ниже частоты обнаружения мРНК RAGE-4. Наиболее часто выявлялись в крови и в опухолевых очагах мРНК HAGE и TRAG-3, затем мРНК GAGE(1-8)-PAGE-1 и XAGE-1a-b, а значительно реже мРНК MAGE-A(1-6), MAGE-C1 и NY-ESO-1. Матричная РНК большинства исследуемых СТ генов обнаруживается в крови больных РП сравнительно реже, чем в образцах опухолей. Однако, мРНК TRAG-3 в крови определялась чаще, чем в образцах опухолевых очагов, что можно объяснить неоднородностью опухолевых очагов, использованных для анализа. В образцах крови мРНК NY-ESO-1 не встречалась одновременно ни в одном образце совместно с мРНК HAGE.

Частота встречаемости мРНК исследованных СТ генов у больных РП при наличии метастазов и при их отсутствии значительно различалась. При этом в опухолевых очагах при наличии метастазов мРНК MAGE-C1, MAGE-A(1-6) и NY-ESO-1, также как и мРНК RAGE-4, встречались достоверно чаще, чем при их отсутствии ($p < 0,05$). Напротив, частота встречаемости мРНК XAGE-1a-b, TRAG-3 и HAGE была выше при отсутствии метастазов ($p < 0,05$). У больных с благоприятным течением заболевания в ткани опухолевых очагов часто присутствовали мРНК XAGE-1a-b и TRAG-3. При неблагоприятном течении РП в образцах опухолей и в крови обнаруживались мРНК RAGE-4, MAGE-C1, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1 и MAGE-A(1-6).

Обнаружено, что мРНК исследуемых СТ генов присутствовала в крови даже на самых первых стадиях РП. Анализ показал различия в частоте выявления мРНК СТ генов на разных стадиях заболевания, а также в частоте выявления индивидуальных мРНК на каждой стадии. Отличительные особенности отмечены для некоторых мРНК. Так, мРНК RAGE-4 была выявлена на всех стадиях РП, в то время как на четвертой стадии во всех образцах опухолей отсутствовала мРНК TRAG-3. Матричная РНК NY-ESO-1 у пациентов на первой и второй стадиях заболевания отсутствовала во всех образцах опухолей, но выявлялась в образцах крови, а мРНК генов MAGE-C1 и HAGE отсутствовали в опухолевых очагах соответственно на первой и четвертой стадиях заболевания. При этом мРНК генов MAGE-C1 и HAGE выявлялись в крови, что можно объяснить возможной потенциальной защитной ролью этих СТ генов, которая может способствовать уклонению от иммунологического надзора и выживанию опухолевых клеток. По-видимому, в процессе инвазии и циркуляции с током крови в опухолевых клетках может происходить изменение профиля экспрессии генов в ответ на смену окружающих условий. Таким образом, экспрессия некоторых СТ генов может защищать опухолевые клетки от апоптоза и способствовать злокачественной прогрессии. Это указывает на различия в структуре транскриптома злокачественно трансформированных клеток больных РП в опухолевых очагах и метастазирующих клеток, мигрирующих в кровь.

Растворимые формы поверхностных протеинов клеток иммунной системы обладают иммунорегуляторными свойствами. Они выполняют функции ограничителей или активаторов иммунных реакций, участвуя в передаче активационных сигналов [15]. Кроме того, при различных заболеваниях сывороточный уровень мембранных рецепторов служит мониторинговым показателем течения патологического процесса [15, 107]. Исследование сывороточного содержания растворимых молекул CD54, CD25 и CD95 в сыворотки крови больных РП показало значительное повышение содержания

молекул CD95 по сравнению с нормой. Различия были зарегистрированы на разных стадиях опухолевого процесса для всех исследуемых молекул (CD54, CD25 и CD95), так что прогрессия заболевания сопровождалась еще более выраженным подъемом сывороточного уровня растворимых форм исследованных белков.

Содержание растворимых молекул CD54 уже на первой и второй стадиях значительно превышало норму ($P < 0,05$). Повышение сывороточного уровня sCD54 за счет шеддинга с поверхности клетки и как следствие понижения экспрессии мембранного CD54 может приводить к ослаблению цитотоксической функции клеток, так как уменьшается возможность формирования межклеточных контактов между иммунокомпетентными клетками и клетками опухоли, что может приводить к снижению вероятности поступления в клетки дополнительных активационных сигналов и способствовать уходу опухоли от иммунологического надзора [245, 225]. Нарушение баланса между мембранными и растворимыми формами молекул адгезии может вносить свой вклад в развитие опухоли. Сывороточное содержание ICAM-1 увеличивается при отсутствии в опухолях мРНК его альтернативной формы. Это значит, что растворимый ICAM-1, образующийся в результате альтернативного сплайсинга в опухолевых клетках не оказывает влияния на общую концентрацию молекул ICAM-1. Результаты нашего исследования показывают, что делетированная форма мРНК ICAM-1 **детектируемая** только у больных без метастазов может играть роль в процессах метастазирования опухолевых клеток при раке почки.

Физиологические концентрации растворимых молекул CD25 у здоровых людей регулируют взаимодействие в цитокиновой сети. Значительное повышение их концентрации у больных раком приводит к формированию иммуносупрессии, так как они конкурируют за связывание интерлейкина-2 на поверхности лимфоцитов [12]. Повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD25 у больных РП является отражением угнетения противоопухолевого иммунного ответа и маркером тяжелого течения заболевания. Гиперпродукция растворимой формы CD25 характерна для поздних

стадий развития онкологических заболеваний [219]. Повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD25 у больных РП зарегистрировано при прогрессии заболевания и было связано с наличием мРНК CD25Exo4Del в опухолевых очагах, что позволяет предполагать выполнение этой делетированной формы мРНК регулирующие иммунного ответа функции. Растворимая форма полноразмерного CD25 антигена, сходящая с поверхности опухолевых клеток, может оказывать иммуносупрессивный эффект, конкурируя за связывание лиганда с рецепторами на поверхности лимфоцитов. При данных условиях, белок кодируемый делетированной формы CD25Exo4Del, наоборот, может препятствовать уходу опухоли из-под надзора иммунной системы задерживая иммуносупрессию. Высокие концентрации растворимых молекул Fas в крови могут приводить к подавлению иммунного ответа и участвовать в развитии заболевания. Они таким образом сокращают чувствительности клеток к апоптозу что приводит к уходу опухоли из-под контроля иммунной системы.

Подъем уровня растворимого CD95, отражающий активацию Fas-опосредованного апоптоза у больных РП, оказался статистически достоверным по сравнению с нормой и был зарегистрирован в сыворотке крови при прогрессии заболевания от первой к четвертой стадии ($P < 0,05$). Полученные данные позволяют предположить, что высокий сывороточный уровень sCD95 у пациентов с РП не является производным опухоли, а отражает иммунный ответ на опухолевую нагрузку. Кроме этого сывороточный уровень растворимых молекул CD95 может составлять эффективный индикатор опухолевой нагрузки у пациентов с РП [177].

Сопоставление особенностей экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ, с особенностями транскриптома опухолевых клеток, связанными с экспрессией раково-тестикулярных генов, показали, что присутствие ассоциированной с благоприятным течением рака почки мРНК TRAG-3 сопровождалось высокой экспрессией мРНК Fas, приводящей к повышению чувствительности клеток опухолевых очагов к Fas-опосредованному апоптозу.

Это указывает на возможную положительную регуляторную роль TRAG-3 в экспрессии Fas гена.

Альтернативная форма мРНК ICAM-1 чаще обнаруживалась в опухолевых очагах РП, не содержащих RAGE-4, и у пациентов, не имеющих метастазов. Альтернативная форма мРНК CD25Exo4Del чаще обнаруживалась в образцах, не содержащих маркер неблагоприятного прогноза заболевания NY-ESO-1. Обнаружение альтернативных форм мРНК ICAM-1 и мРНК CD25 без 4 экзона в опухолях при раке почки является показателем более благоприятного течения заболевания по сравнению с опухолями, не содержащими данных альтернативных форм. По-видимому, образование альтернативных форм мРНК ICAM-1 с делецией в регионе, кодирующем трансмембранный регион белка или мРНК CD25 с делецией региона, отвечающего за связывание IL-2, является компенсаторным механизмом, ограничивающим гиперэкспрессию функциональных белков ICAM-1 и CD25 на поверхности опухолевой клетки.

Установлено также, что транскриптом клеток опухолевых очагов, характеризующийся отсутствием мРНК RAGE-1, статистически значимо чаще содержал мРНК полноразмерных форм CD54 и CD95 и альтернативной формы CD54TMDel. Известно, что ингибирование экспрессии RAGE-1 малыми интерферирующими РНК (siRNA) достоверно снижает инвазивную способность клеток гепатоцеллюлярной карциномы и в то же время уменьшает экспрессию и активность матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9). Более того, было показано, что одновременная высокая экспрессия RAGE-1 и MMP-9 коррелирует с плохим прогнозом для пациентов. Кроме этого, siRNA-опосредованный нокдаун RAGE-1 в клеточных линиях карциномы печени SK-HEP1 привел к подавлению инвазивности этих клеток путем регулирования экспрессии и ферментативной активности MMP-9 [106]. Известно, что протеолитическая активность MMP-9 приводит к сходу с поверхности клеток ICAM-1 и IL-2R α и подавляет пролиферативную способность Т-клеток [83, 214]. Это указывает на роль MMP-9 и, следовательно, RAGE-1 в иммуносупрессии, инвазии опухолевых клеток и метастазировании.

Таким образом, выявленные в ходе работы особенности транскриптома крови и опухолевых очагов больных раком почки свидетельствуют о наличии группы молекулярно-иммунологических показателей, которые по своей природе являются транскриптами генов иммунного ответа и раково-тестикулярных генов и могут выступать в качестве биомаркеров, имеющих мониторинговое значение.

5. ВЫВОДЫ

1. В опухолевых очагах и крови больных раком почки имеются альтернативные формы мРНК ICAM-1, IL-2R α и Fas. Альтернативная форма мРНК ICAM-1, кодирующая белок без трансмембранного домена, выявляется в опухолевых очагах только в отсутствии метастазов. Присутствие альтернативной формы мРНК IL-2R α (CD25Exo4-5Del) сочетается с благоприятным течением рака почки.

2. При раке почки мРНК RAGE встречается чаще, чем при раке тела матки, толстой кишки и раке легких. Присутствие альтернативных вариантов мРНК гена RAGE сочетается с прогрессией опухоли, с метастатическим потенциалом, а также с низкодифференцированными опухолями.

3. При раке почки в опухолевых очагах и крови мРНК RAGE-4 встречается чаще, чем мРНК других исследованных раково-тестикулярных генов. Во многих случаях обнаруживаются и мРНК HAGE и TRAG-3 генов. Наличие мРНК XAGE-1a-b и TRAG-3 в опухолях почки сочеталось с благоприятным течением рака почки, а мРНК RAGE-4, MAGE-C1, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1 и MAGE-A(1-6) в образцах опухолей и в крови - с неблагоприятным течением заболевания.

4. В опухолевых очагах больных раком почки полноразмерная форма мРНК CD95 детектируется чаще совместно с мРНК раково-тестикулярного гена TRAG-3 и мРНК CD54TMDel, и реже в присутствии мРНК RAGE-1. Форма CD25Exo4-5Del детектируется чаще совместно с мРНК CD54TMDel и CD95Exo6Del. Альтернативная форма CD54TMDel также обнаруживается чаще в опухолевых очагах РП, не содержащих мРНК RAGE-4.

5. У больных раком почки повышено сывороточное содержание растворимых молекул CD25, CD54 и CD95 что сопровождается изменениями в спектре альтернативных форм мРНК CD25 и CD54 в опухолевых очагах.

Практические рекомендации.

Определение альтернативных форм мРНК CD25 и CD54, а также мРНК RAGE-4, XAGE-1a-b и TRAG-3, MAGE-C1, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1 и MAGE-A(1-6) может быть рекомендовано для мониторинга больных раком почки.

Поскольку матричная РНК исследованных раково-тестикулярных генов присутствует в крови больных на самых первых стадиях РП, тест на определение мРНК данной группы генов может быть применен для диагностики рака почки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	– комплементарная ДНК
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
пре-мРНК	– предшественник матричной РНК
HLA	– антигены лейкоцитов человека
CTL	– цитотоксические Т-лимфоциты
а.о.	– аминокислотные остатки
н.о.	– нуклеотидные основания
п.н.о.	– пары нуклеотидных оснований
СТ гены	– раково-тестикулярные гены
ОРС	– открытая рамка считывания
дНТФ	– дезоксинуклеозидтрифосфаты
ОТ-ПЦР	– обратная транскрипция/полимеразная цепная реакция
РП	– рак почки
РТМ	– рак тела матки
РТК	– рак толстой кишки
РЛ	– рак легких
RAGE	– антиген ассоциированный с раком почки
ICAM-1 (CD54)	– молекула межклеточной адгезии-1
sCD54	– растворимая форма CD54 антигена
IL-2R α (CD25)	– альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2
sCD25	– растворимая форма CD25 антигена
Fas (CD95)	– фрагмент стимулирующий апоптоз
sCD95	– растворимая форма CD95 антигена
U/ml	– количество условных единиц в мл

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеенко, А.И. Новая диагностика рака: теория, диагностика, лечение, реабилитация / А.И. Агеенко // Монография для врачей. М. Медицина XXI. -2004. - С. 408.
2. Алексеев, Б. Я. Неоадьювантная таргетная терапия у больных почечно-клеточным раком / Б. Я. Алексеев, К. М. Ньюшко, А. С. Калпинский // Онкоурология. - 2015. - № 2. - С. 23-33.
3. Бабаев, А.А. Растворимые комплексы молекул адгезии в сыворотке крови человека / А.А. Бабаев, Г.А. Кравченко, Т.А. Ятманова и Др // Иммунология. - 2003. - № 5. - С. 128-132.
4. Балдуева, И.А. Противоопухолевые Вакцины / И.А. Балдуева // НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, Минздрава РФ, Санкт Петербург. - 2003. - № 371. - С. 615-616.
5. Барышников, А.Ю. Взаимоотношение опухоли и иммунной системы организма / А.Ю. Барышников // Практическая онкология. - 2003. - Т.4. - № 3. - С.127-131.
6. Буеверов, А.О. Апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV- инфекциях / А.О. Буеверов, Е.В. Тихонина, Е.Ю. Москалева и др // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. - 2000. - № 6. - С. 33-36.
7. Дейчман, Г.И. Современные концепции иммунологических взаимоотношений опухоли и организма. Глава в кн. «Опухолевый рост как проблема биологии развития» / Г.И. Дейчман // Изд. «Наука», Москва. - 1979. - С. 208-230.
8. Курынин, Р.В. Молекулярные маркеры в диагностике и лечении рака почки / Р.В. Курынин, Д.С. Михайленко, Д.В. Залетаев и др // Молекулярная медицина. - 2008. - № 4. - С. 24-28.
9. Лазаревич, Н.Л. Молекулярные Механизмы Прогрессии Опухолей Печени / Н.Л. Лазаревич // биология и химия. - 2004. - Т. 44. - С. 365-418.
10. Маниатис, Т.. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук // М. МИР. - 1984. - С. 304.

- 11.Новиков, В.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы / В.В. Новиков, А.Ю. Барышников, А.В. Караулов // Иммунология. - 2007. - № 5. - С. 249-253.
- 12.Новиков, В.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы / В.В. Новиков, А.В. Караулов, А.Ю. Барышников // Медицинское информационное агентство. - 2008. - С. 249.
- 13.Новиков, В.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы / В.В. Новиков, А.В. Караулов, А.Ю. Барышников // М.: МИА. - 2008б. - С. 243.
- 14.Новиков, В.В. Альтернативная жизнь мембранных антигенов клеток иммунной системы при вирусных гепатитах / В.В. Новиков, Г.А. Кравченко, А.А. Бабаев // Медицинский альманах. - 2009. - Т. 7. - № 2. - С. 142-146.
- 15.Новиков, В.В. Иммунология / В.В. Новиков, Н.А. Добротина, А.А. Бабаев // Учебное пособие. - 2005. - С. 144-147.
- 16.Новиков, Д.В. Метод сравнительной оценки экспрессии мРНК мембранной и доминирующей растворимой форм Fas-антигена с использованием ПЦР в реальном времени / Д.В. Новиков, М.Ю. Лебедев, О.В. Уткин и др // Матер. III Моск. Межд. Конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития». - 2005. - Ч. 1. - С. 195-196.
- 17.Перельмутер, В.М. Прогностическое значение инфильтрации стромы молочной железы иммунокомпетентными клетками / В.М. Перельмутер, Н.В. Чердынцева, Е.М. Слонимская и др // Вop. онкол. - 1997. - № 43. - С. 596-598.
- 18.Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. - 2002. - № 4. - С. 235-242.
- 19.Тюряева, И.И. Опухолевые антигены / И.И. Тюряева // Цитология. - 2008. - Т. 50. - № 3. - С. 189-209.
- 20.Хаитов, Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин // М., ГЭОТАР -Медиа. - 2000. - С. 430.

- 21.Чехун, В. Эпигенетика Рака / В. Чехун // Онкология. - 2008. - Т. 10. - № 3. - С. 301-302.
- 22.Шубич, М.Г. Медиаторные аспекты воспалительного процесса/ М.Г. Шубич, М.Г. Авдеева// Архив патологии. - 1997. - №2. - С.3-8.
- 23.Ярилин, А.А. Введение в современную иммунологию / А.А. Ярилин, Н.А. Добротина // Н.Новгород: ННГУ. - 1997. - С. 238.
- 24.Ярилин, А. А. Основы иммунологии / А. А. Ярилин // М.: Медицина, - 2000. - С. 607.
- 25.Adam, J.L. The Helicase HAGE Expressed by Malignant Melanoma-Initiating Cells Is Required for Tumor Cell Proliferation in Vivo / J.L. Adam, G.M. Morgan, K.M. Amanda, and R. Tark // J. Biol. Chem. - 2012. - Т. 287. - № 13. -С. 633-643.
- 26.Adamashvili, I. Soluble HLA in saliva of patients with autoimmune rheumatic diseases / I. Adamashvili, T. Pressly, H. Gebel et al. // Rheumatol. Int. - 2002. - V. 22. - P. 71-76.
- 27.Ahmed, N.N. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase / N.N. Ahmed et al // Natl. Acad. Sci. - 1997. - Т. 94. - V. 8. - P. 27-32.
- 28.Ali, O.G. Cancer-Testis Genes Are Coordinately Expressed and Are Markers of Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer / O.G. Ali, C. Ramon, W. Barbara et al. // Clin Cancer Res. - 2005. - V. 11. - P. 55-62.
- 29.Alpin, A.E. Integrin signaling and cell growth control / A.E. Alpin, A. Howe, S.K. Alahari et al. // Curr. Opin. Cell Biol. -1998. -V. 10. -P. 220.
- 30.Amitabh, R., Long natural history and spontaneous regression: a rare outcome of metastatic renal cell carcinoma / R. Amitabh, k. G. Sunil // radiology and oncology. - 2014. - V. 3. - №. 5. - P. 447–449.
- 31.Anja, K. Down-regulation of the cancer/testis antigen 45 (CT45) is associated with altered tumor cell morphology, adhesion and migration / K. Anja, S. Nadia, A.K. Sabine, L. Marcus, K. Dieter, J. Ottmar et al. // Cell Communication and Signaling. - 2013. - V. 11. - P. 41.

32. Atanackovic, D. Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 are central survival factors for multiple myeloma cells / D Atanackovic, Y Hildebrandt, A Jadcak, Y Cao, T Luetkens et al. // *Haematologica*. - 2010. - V. 95: - P.785-793.
33. Banks, R.E. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer / R.E. Banks, P. Tirukonda, C. Taylor et al. // *Cancer Res*. - 2006. - T. 66. - V. 4. - P. 2000–2011.
34. Barker, P.A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease / P.A. Barker, A. Salehi // *J. Neurosci. Res*. - 2002. - V. 67. - P. 705–712.
35. Bauernhofer, T. Role of prolactin receptor and CD25 in protection of circulating T lymphocytes from apoptosis in patients with breast cancer / T. Bauernhofer, I. Kuss, U. Friebe-Hoffmann et al. // *Br. J. Cancer*. - 2003. - V. 88. - № 8. - P. 1301-1309.
36. Bezrodnik, L. Follicular bronchiolitis as phenotype associated with CD25 deficiency / L. Bezrodnik, M. S. Caldirola, A. G. Seminario, I. Moreira, M. I. Gaillard // *Clinical & Experimental Immuno*. - 2014. - V. 175, - T. 2, - P. 227–234.
37. Bonnomet, A. Role Du Gene Hnanos1 Dans Le Processus D'invasion Tumorale / A. Bonnomet // *These De Doctorat*. -2006. , - P. 23–25.
38. Brichard, V. MAGE-A3-specific anticancer immunotherapy in the clinical practice / V. Brichard and Q. Godechal // *OncoImmunology*. - 2013. - T. 2. - № 10. - P. 1-3.
39. Brinkmann, U. PAGE-1, an X chromosome-linked GAGE-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus / U. Brinkmann, G. Vasmatzis, B. Lee, N. Yerushalmi, M. Essand, and I. Pastan // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1998. - V. 95. - P. 757-762.
40. Bukowski, R.M. Immunotherapy in renal cell carcinoma / R.M. Bukowski // *Oncology*. - 1999. - V. 13. - P. 801–809.
41. Burton, J. Association of intercellular adhesion molecule 1 with the multichain high-affinity interleukin 2 receptor / J. Burton, C.K. Goldman, P. Rao, M. Moos, T.A. Waldmann // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1990. - V. 87. - № 18. - P. 29-33.
42. Cancer-testis Antigens database. Веб сайт. Режим доступа: URL: <http://www.cta.lncc.br/model.php>.

- 43.Cascino, I. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing / I. Cascino, C. Fiucci, C. Papoff et al. // J. Immunol. - 1995. - V. 8. - P. 2706-2713.
- 44.Celis, E. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes / E. Celis, V. Tsai, C. Crimi, P. A. Wentworth et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1994. - V. 91. - P. 5-9.
- 45.Champagne, B. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase 1 / B. Champagne, P. Tremblay, A. Cantin, Y.S. Pierre // J. Immuno. - 1998. - V. 161. - P. 398 -405.
- 46.Chen, C. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development / C. Chen, E. Stockert, S. Tsang, K. A. Copian, L. J. Old // Proc. Nati. Acad. Sci. USA. - 1995. - V.92. - P. 125-129.
- 47.Chen, M.E. Isolation and characterization of PAGE-1 and GAGE-7 / M.E. Chen, S.H. Lin, L.W. Chung, R.A. Sikes // J. Biol. Chem. - 1998. - V. 273. - P. 618-625.
- 48.Chen, Q. The methylation status of the DDX43 promoter in Chinese patients with chronic myeloid leukemia / Q. Chen, J. Lin, J. Qian, Z.Q. Deng, J. Yang, Y. Li et al. // Genet Test Mol Biomarkers. - 2013. - V. 17. - № 6. - P. 508-511.
- 49.Chen, Y.T. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening / Y.T. Chen, M.J. Scanlan, U. Sahin, O. Türeci, A.O. Gure, S. Tsang et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997a. - V. 94. - № 5. - P. 914-918.
- 50.Chen, Y.T. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library / Y.T. Chen, O.G. Ali, T. Solam, E. Stockert, E. Jaeger, A. Knuth, L.J. Old // Immunology. - 1998. - V. 95, - P. 919-923.
- 51.Chen, Y.T. Cancer/Testis Antigen Expression in Digestive Tract Carcinomas: Frequent Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and its Precursor Lesions / Y.T. Chen et al. // Cancer Immunology Research. -2013. - V. 11. - № 58. - P. 13-24.
- 52.Cho, B. Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE / B. Cho, Y. Lim, D.Y. Lee et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2002. - V. 292. - № 3. - P. 715-726.

- 53.Chomez, P. An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family / P. Chomez, O. Backer, M. Bertrand et al. // Cancer Reseach. - 2001. - V. 61. - P. 44-51.
- 54.Chomyszynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomyszynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. - 1987. - V. 162. - P. 156–159.
- 55.Chotirat, R. MLK3 Signaling in Cancer Invasion / R. Chotirat, K. A. Gallo // Cell and Molecular Biology Cancer. - 2016. - V. 8. - №. 51. - P. 2–17.
- 56.Christoph, F. Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in kidney cancer / F. Christoph, C. Kempkensteffen, S. Weikert et al. // Br.J. Cancer. - 2006a. - V. 95. - №. 8. - P. 701-707.
- 57.Cilensek, Z.M. A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation / Z.M. Cilensek, F. Yehiely, R.K. Kular, L.P. Deiss // Cancer Biol. - 2002. - V. 1. - P. 380–387.
- 58.Coral, S. Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) / S. Coral, L. Sigalotti, A. Gasparollo et al. // J Immunother. - 1999. - V. 22. - P. 16-24.
- 59.Cordin, O. The DEAD box protein family of RNA helicases / O. Cordin, J. Banroques, N.K. Tanner, P. Linder // Gene. - 2006. - V. 29. - № 367. - P. 17-37.
- 60.Cosman, D. Cloning, sequence and expression of human interleukin-2 receptor / D. Cosman // Nature. - 1984. - V. 312. - № 59. - P. 768-771.
- 61.Cronwright, G. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression / G. Cronwright, K. Le Blanc, C. Gotherström, P. Darcy, M. Ehnman et al. // Cancer Res. -2005. - V. 65. - № 19. - P. 207-215.

- 62.De Backer, O. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis / O. De Backer, K.C. Arden, M. Boretti et al. // *Cancer Res.* -1999. - V. 59. - № 31. - P. 57-65.
- 63.De Plaen, E. Structure, localization and expression of twelve genes of the MAGE family / E. De Plaen, K. C. Arden, C. Traversari, J. Gaforio, J.P. Szikora, C. De Smet, F. Brasseur, P. van der Bruggen et al. // *Immunogenetics.* - 1994. - V. 40. - P. 360-369.
- 64.De Smet, C. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter / C. De Smet, C. Lurquin, B. Lethe, V. Martelange, T. Boon // *Mol Cell Biol.* - 1999. - V.19. - № 73. - P. 27-35.
- 65.Deeths, M.J. ICAM-1 and B7-1 provide similar but distinct costimulation for CD8+ T cells, while CD4+ T cells are poorly costimulated by ICAM-1 / M.J. Deeths, M.F. Mescher // *Eur J Immunol.* - 1999. - V. 29. - P. 45-53.
- 66.Dejica, D. Serum soluble IL-2 receptor as a marker of lymphocyte activation in some autoimmune diseases. Effect of immunosuppressive therapy / D. Dejica // *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* - 2001. - V. 60. - № 3. - P. 183-201.
- 67.Dendorfer, U. Interleukin-2 and the interleukin-2 receptor / U. Dendorfer, W. Maslinski, B. Remillard, T.B. Strom // *Transplant Sci.* - 1993. - V. 26. - № 3. - P. 83-91.
- 68.Devos, J. MAGEL2, a Prader-Willi syndrome candidate gene, modulates the activities of circadian rhythm proteins in cultured cells / J. Devos, S.V. Weselake, R. Wevrick // *J. Circadian Rhythms.* - 2011. - V. 9. - № 1. - P. 12–21.
- 69.Dhein, J. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens / J. Dhein, P.T. Daniel, B.C. Trauth et al. // *J. Immunol.* - 1993. - V. 149. - P. 66-73.
- 70.Diamond, M.S., Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation / M.S. Diamond, D.E. Staunton, S.D. Marlin, T.A. Springer // *Cell.* - 1991. - № 65. - P. 961.
- 71.Duan, Z. TRAG-3, a novel gene, isolated from a taxol-resistant ovarian carcinoma cell line / Z. Duan, A.J. Feller, H.C. Toh, T. Makastoris, M.V. Seiden // *Gene.* - 1999. - V. 229. - P. 75-81.

- 72.Dummer, R., Circulating interleukin-2 receptors are a group of multimeric proteins with immunoreactivity for interleukin-2 receptor alpha, beta, and gamma chains / R. Dummer, G. Posseckert, K. Sugamura et al. // J. Interferon Cytokine Res. - 1996. - V. 16. - № 4. - P. 315-320.
- 73.Ebert, L.M. A Cancer Vaccine Induces Expansion of NY-ESO-1-Specific Regulatory T Cells in Patients with Advanced Melanoma / L.M. Ebert, S.E. MacRaid, D. Zanker, I.D. Davis, J. Cebon et al. // PLoS ONE. - 2012. - V. 7. - № 10. - P. 42-48.
- 74.Egland, K.A. Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers / K.A. Egland, V. Kumar, P. Duray, I. Pastan // Mol Cancer Ther. - 2002. - V. 1. - № 4. - P. 41–50.
- 75.Eichmüller, S. mRNA expression of tumor-associated antigens in melanoma tissues and cell lines / S. Eichmüller, D. Usener, A. Jochim, and D. Schadendorf // Exp Dermatol. - 2002. - V. 11. - P. 292-301.
- 76.Eichmüller, S. Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity / S. Eichmüller, D. Usener, A. Jochim, and D. Schadendorf // Int J Cancer. - 2003 - V. 104. - P. 482-487.
- 77.Elangbam, C.S. Cell Adhesion Molecules – Update / C.S. Elangbam, C.W. Qualls, R.R. Dahlgren // Vet. Pathol. - 1997. - V. 34. - P. 61-73.
- 78.Elfving, P. Prognostic implications of cytogenetic findings in kidney cancer / P. Elfving, N. Mandah, R. Lundgren, J. Limon, E. Bak-Jensen, M. Ferno, H. Olsson, F. Mitelman // Br J Urol. - 1997. - V. 80. - № 5. - P. 698-706.
- 79.Emmet, M.C. Bi-specific TCR-anti CD3 redirected T-cell targeting of NY-ESO-1- and LAGE-1-positive tumors / M.C. Emmet, J.A. Katherine, J.H. Namir, K. Akhil, M.L. Nikolai et al. // Cancer Immunol Immunother. - 2013. - V. 62. - P. 773-785.
- 80.Fabricio, C. Targeting MAGE-C1/CT7 Expression Increases Cell Sensitivity to the Proteasome Inhibitor Bortezomib in Multiple Myeloma Cell Lines / C. Fabricio, T.C. Erico, A.C. Anamaria, C.G. Juliana, M. Cibeles et al. // PLoS ONE. - 2011. - V. 6. - № 11. - P. 27-34.
- 81.Fabricio, C. MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 are frequently expressed in multiple myeloma and can be explored in combined immunotherapy for this

- malignancy / C. Fabricio, L.F. Veruska, M.T. Walter, V. Celso, J. Xavier, W.B. Gisele // *Cancer Immunol Immunother.* - 2013. - V. 62. - P. 191-195.
- 82.Feller, A.J. TRAG-3, a novel cancer/testis antigen, is overexpressed in the majority of melanoma cell lines and malignant melanoma / A.J. Feller, Z. Duan, R. Penson, H. Toh, M.V. Seden // *Anticancer Res.* - 2000. - V. 20. - № 41. - P. 47–51.
- 83.Fiore, E. Matrix metalloproteinase 9 MMP-9/gelatinase B proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity / E. Fiore, C. Fusco, P. Romero, I. Stamenkovic // *Oncogene.* - 2002. - V. 21. - № 34. - P. 213-223.
- 84.Flad, T. Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method / T. Flad, B. Spengler, H. Kalbacher, P. Brossart, D. Baier et al. // *Cancer Res.* - 1998. - V. 58. - P. 803-811.
- 85.Forrester, K. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis / K. Forrester, C. Almoguera, K. Han, W.E. Grizzle, M. Perucho // *Nature.* - 1987. - V. 327. - P. 298-303.
- 86.Gang, Z. CD41 T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: Association with NY-ESO-1 antibody production / Z. Gang, W. Xiang, F.R. Paul, A.R. Steven, and W. Rong-Fu et al. // *PNAS.* - 2001. - V. 98. - № 7. - P. 64-69.
- 87.Gardiner, E.E. Sequences within fibrinogen and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) modulate signals required for mitogenesis / E.E. Gardiner, S.E. D'Souza // *J. Biol. Chem.* - 1999. - № 274. - P. 930-936.
- 88.Gaugler, B. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma / B. Gaugler, N. Brouwenstijn, V. Vantomme et al. // *Immunogenetics.* - 1996. - V. 44. - P. 23–30.
- 89.Gene database: DDX43 OTTHUMG00000015033. Веб сайт: URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary/OTTHUMT00000041219
- 90.Gertner, J. Optimisation de l'activité antitumorale des lymphocytes T V γ 9V δ 2 humains / J. Gertner // *Immunologie.* - 2008. - P. 16-21.

91. Gjerstorff, M.F. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members / M.F. Gjerstorff, H.J. Ditzel // *Tissue Antigens*. - 2008. - V. 71. - № 3. - P. 187-192.
92. Glaser, R. Tumor site immunemarkers associated with risk for subsequent basal cell carcinomas / R. Glaser, R. Andridge, E.V. Yang et al. // *PLoS One*. - 2011. - V. 6. - № 9. - P. 51-60.
93. Goebeler, M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in mouse allergic contact dermatitis / M. Goebeler, J. Gutwald, J. Roth et al. // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* - 1990. - № 93. - P. 294-299.
94. Goodyear, O. Induction of a CD8⁺ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia / O. Goodyear, A., Agathangelou, I. Novitzky et al. // *Blood*. - 2010. - V. 116. - № 11. - P. 908-918.
95. Götte, K. Tumor associated antigens as possible targets for immune therapy in head and neck cancer: Comparative mRNA expression analysis of RAGE and GAGE genes / K. Götte, D. Usener, F. Riedel, K. Hörmann, D. Schadendorf, and S. Eichmüller // *Acta Otolaryngol.* - 2002. - V. 122. - P. 546-552.
96. Gupta, A. A novel human-derived antibody against NY-ESO-1 improves the efficacy of chemotherapy / A. Gupta, N. Natko, C. Esslinger et al. // *Cancer Immunity*. 2013. V. 13. P. 3.
97. Hamai, A. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway / A. Hamai, F. Meslin, H. Benhalem et al. // *Cancer Res.* - 2008. - V. 68. - N, 23. - P. 54-64.
98. Hamblin, A.S. Lymphokines and interleukins / A.S. Hamblin // *Immunology*. - 1988. - V. 1. - P.39-41.
99. Hamer, G. Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex / G. Hamer, K. Gell, A. Kouznetsova, I. Novak et al. // *J. Cell. Sci.* - 2006. - V. 119. - № 19. - P. 25–32.
100. Heaney, M.L. Soluble receptors in human disease / M.L. Heaney, D.W. Gold // *Journal of Leukocyte Biology*. - 1998. - V. 87. - № 3. - P. 847-857.
101. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis / M.O. Hengartner // *Nature*. - 2000. - V. 407. - P. 770-776.

102. Hirofumi, M. Immunogenicity of cancer/testis antigen *XAGE-1d* in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) / M. Hirofumi, O. Yoshihiro, E. Shingo, M. Yu et al. // *Cancer Research*. - 2012; - V. 72. - № 8. - P. 45-58.
103. Homo sapiens G antigen Веб сайт. Режим доступа: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_012550.1.
104. Huang, A. The presence of interleukin-2 receptor alpha in the serum of colorectal cancer patients is unlikely to result only from T cell up-regulation / A. Huang, H. Quinn, C. Glover et al. // *Cancer Immunol*. - 2002. - V. 51. - № 1. - P. 53-57.
105. Huang, W. Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel α -methylene- γ -butirolactone derivatives / W. Huang, S. Chan, T. Yang et al. // *Carcinogenesis*. - 2004. - V. 25. - № 10. - P. 1925–1934.
106. Hyung, J.C. Overexpression of Renal Tumor Antigen Is Associated with Tumor Invasion and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma / J.C. Hyung, K. Jongmin, M.H. Sun et al. // *Ann Surg Oncol*. - 2012. - V. 19. - P. 404–411.
107. Inostroza, J. Quantitation of soluble HLA class I heterodimers and beta 2-microglobulin in patients with active pulmonary tuberculosis / J. Inostroza, P. Munoz, R. Espinoza et al. // *Hum. Immunol*. - 1994. - Vol. 40. - № 3. - P. 179-182.
108. Ip, J.Y. Global analysis of alternative splicing during T-cell activation / J.Y. Ip, A. Tong, Q. Pan et al. // *RNA*. - 2007. - № 13. - P. 563–572.
109. Ishida, N. Molecular cloning and structure of the human interleukin 2 receptor gene / N. Ishida, H. Kanamori, T. Noma et al. // *Nucleic Acids Research*. - 1985. - V.13, - № 21. - P. 7579-7589.
110. Jagadish, N. Sperm associated antigen 9 (SPAG9): a new member of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein exclusively expressed in testis / N. Jagadish, R. Rana, D. Mishra et. al. // *Keio J. Med*. - 2005. - V. 54, - № 2. - P. 66–71.
111. Janjic, B. Spontaneous CD4⁺ T cell responses against TRAG-3 in patients with melanoma and breast cancers / B. Janjic, P. Andrade, X.F. Wang, J. Fourcade, C. Almunia et al. // *J. Immunol*. - 2006. - V. 177. - № 27. - P. 17-27.

112. Jemal, A. Global cancer statistics / A. Jemal, F. Bray, M. Center et al. // *CA Cancer J Clin.* - 2011. - V. 61. - P. 69-90.
113. Jianda, Y. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8⁺ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab / Y. Jianda, A. Matthew, A.G. Brian et al. // *Current Issue.* – 2011. - V. 108. - № 40. - P. 73-81.
114. John, T. The Role of Cancer-Testis Antigens as Predictive and Prognostic Markers in Non- small cell lung cancer / T. John, M. Starmans, Y-T. Chen, P.A. Russell, S.A. Barnett et al. // *Journal PLoS ONE.* - 2013. - V. 8. - № 7. - P. 67-78.
115. Johnson, A.B. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription / A.B. Johnson, N. Denko, and M.C. Barton // *Mutat. Res.* - 2008. - V. 640. - P. 174–179.
116. Jong, S. XAGE-1a and XAGE-1d are potential biomarkers of lung squamous cell carcinoma / S. Jong, S. Yeong, K. Seon-Young et al. // *XClinica Chimica Acta.* - 2012. - V. 413. - P. 1226–1231.
117. Jungbluth, A.A. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues / A.A. Jungbluth, Y.T. Chen, E. Stockert et al. // *Int. J. Cancer.* - 2001. - V. 92. - P. 856-860.
118. Kalejs, M. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and «brainstorming» session / M. Kalejs, J. Erenpreisa // *Cancer Cell Int.* - 2005. - V.5. - № 1. - P.4-5.
119. Kamihira, S. Discrepant expression of membrane and soluble isoforms of Fas (CD95/APO-1) in adult T-cell leukaemia: soluble Fas isoform is an independent risk factor for prognosis./ S. Kamihira, Y. Yamada, M. Tomonaga et al. // *Br.J Haematol.* - 1999. - V. 107. - № 4. - P. 51-60.
120. Kamitani, T. Activation-induced aggregation and Processing of the Human Fas-antigen / T. Kamitani, H. P. Nguyen, E. Yeh // *J. Biol. Chem.* - 1997. - V. 272. - P. 307-314.
121. Kaneda, A. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation / A. Kaneda // *Cancer Sci.* - 2004. - V. 95. - P. 58–64.

122. Kang, Y. Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells / Y. Kang, J.A. Hong, G.A. Chen, D.S. Schrupp // *Oncogene*. - 2007. - V. 26. - № 30. - P. 394–403.
123. Katherine, M. Tumor Suppressor Genes and Oncogenes / M. Katherine, Hyland. // *The Hallmarks of Cancer*. Cell. - 2000. - V. 100. - P. 57-70.
124. Kawai, Y. MDA-MB-231 produces ATP-mediated ICAM-1-dependent facilitation of the attachment of carcinoma cells to human lymphatic endothelial cells / Y. Kawai, M. Kaidoh, T. Ohashi // *Cell Phys.* - 2008. - № 295. - P. 123–132.
125. Kikuchi, E. Prolonged survival of patients with lung adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigen1 / E. Kikuchi, K. Yamazaki, E. Nakayama, S. Sato // *Cancer Immunity*. - 2008. - V. 8. - P. 13- 16.
126. Kim, B.R. Generation of anti-tumour immune response using dendritic cells pulsed with carbonic anhydrase IX-Acinetobacter baumannii outer membrane protein A fusion proteins against renal cell carcinoma / B.R. Kim, E.K. Yang, D.Y. Kim et al. // *British Society for Immunology*. - 2012 - V. 167. - P. 73–83.
127. Kim, J.D. Induction of ICAM-1 and HLA-DR expression by IFN-gamma in malignant melanoma cell lines / J.D Kim., J.L Lee., J.H. Park, J.M. Lee, Y.H. Kim, S.J. Kim // *Yonsei Med J.* - 1995. - V. 36. - № 1. - P. 15-25.
128. Kim, Y. Role of CAGE, a novel cancer/testis antigen, in various cellular processes, including tumorigenesis, cytolytic T lymphocyte induction, and cell motility / Y. Kim, D. Jeoung // *J. Microbiol. Biotech.* - 2008. - V. 18. - № 3. - P. 600–610.
129. King, P.D. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing / P.D. King, E.T. Sandberg, A. Selvakumar et al. // *J. Immunol.* - 1995. - V. 154. - P. 60-80.
130. Kischkel, F.C. Cytotoxicity-dependet APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor / F.C. Kischkel, S. Hellbardt, I. Behrmann et al. // *EMBO*. - 1995. - V. 14. - P. 5579-5588.
131. Kozak, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control / M. Kozak // *J Cell Biol.* - 1991. - V. 115. - P. 887–903.
132. Kuhn, D.J. Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation,

drug resistance, and transforming ability / D.J. Kuhn, D.M. Smith, S. Pross, T.L. Whiteside // J Cell Biochem. - 2003. - V. 89. - P. 824-836.

133. Kurashige, T.Y. Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade / T.Y. Kurashige, T.S. Noguchi., T. Ono., Y. Nagata et al. // Cancer Res. - 2001. - V. 61. - № 12. - P. 4671-4674.

134. Kyeong, C.S. MAGE A1-A6 RT-PCR and MAGE A3 and p16 methylation analysis in induced sputum from patients with lung cancer and non-malignant lung diseases / C.S. Kyeong, H.L. Kwan, C.H. Lee et al. // Onco. Rep. - 2012. - V. 27. - P.911-916.

135. Ladelfa, M.F. Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function / M.F. Ladelfa, L.Y. Peche, M.F. Toledo et al // Cancer Lett. - 2012. - V. 325. - № 1. - P. 11–17.

136. Laduron, S. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription / S. Laduron, R. Deplus., S. Zhou et al. // Nucl. Acids Res. - 2004. - V. 32. - № 14. - P. 4340 – 4350.

137. Lawson, C. ICAM-1 signaling in endothelial cells / C. Lawson, S. Wolf // Pharmacol. Rep. - 2009. - V. 61. - № 1. - P. 22-32.

138. Lee, S.H. Homing alone CD18 in infectious and allergic disease / S.H. Lee, H. Seung, and B.C. David // Trends in Molecular Medicine. - 2004. - V. 10. - № 6. - P. 258-262.

139. Leonard, W.J. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor / W.J. Leonard // Nature. - 1984. - V. 311. - № 5987. - P. 626-631.

140. Leonard, W.J. Localization of the gene encoding the human interleukin-2 receptor on chromosome 10 / W.J. Leonard, T.A. Donlon, R.V. Lebo, W.C. Greene // Science. - 1985. - V. 228. - № 4707. - P. 1547-1549.

141. Lethe, B. LAGE-1, a new gene with tumor specificity / B. Lethe, S. Lucas, L. Michaux et al. // Int. J. Cancer. - 1998. - V. 76. - № 6. - P. 903 – 908.

142. Li, G. Serum carbonic anhydrase 9 level is associated with postoperative recurrence of conventional renal cell cancer / G. Li, G. Feng, A. Gentil-Perret et al. // J Urol. - 2008. - V. 180. - № 2. - P. 510–513.
143. Lichter, P. The human APO-1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19 / P. Lichter, H. Walczak, S. Weitz et al. // [Genomics](#). - 1992. - V. 14. - P. 179-80.
144. Lin, C. Cancer/testis antigen CSAGE is concurrently expressed with MAGE in chondrosarcoma / C. Lin, S. Mak, P.A. Meitner, J.M. Wolf, E.M. Bluman, J.A. Block, and R.M. Terek // Gene Amst. - 2002. - V. 285. - P. 269–278.
145. Linley, A. Breast cancer assay / A. Linley, M. Mathieu, S. Mcardle, C. Lu, R. Rees, // Patentscope. - 2013. Веб сайт. Режим доступа: URL: <http://www.patentscope.wipo.int/search/en/WO2013144616>.
146. Lipworth, L. The epidemiology of renal cell carcinoma / L. Lipworth, R.E. Tarone, J.K. McLaughlin // J Urol. - 2006. - V. 176. - № 6. - P. 353-358.
147. Liu, C. Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation / C. Liu, J. Cheng, J.D. Mounts // Biochem. J. - 1995. - V. 310. - P. 957–963.
148. Liu, X.F. XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma / X.F. Liu, L.J. Helman, C. Yeung, T.K. Bera, B. Lee, I. Pastan // Cancer Res. - 2000. - V. 60. - P. 52–55.
149. Liu, Y. Recent duplication and positive selection of the GAGE gene family / Y. Liu, Q., Zhu N. Zhu // Genetica Journal. - 2007. - V. 133. - № 1. - P. 31-35.
150. Ljungberg, B. Prognostic significance of the DNA content in renal cell carcinoma / B. Ljungberg, G. Forsslund, R. Stenling, A. Zetterberg // J Urol. - 1986. - V. 135. - № 2. - P. 422-426.
151. Lucas, S. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis / S. Lucas, C. De Smet, K.C. Arden et al. // Cancer Res. - 1998. - V. 58. - P. 743–752.
152. Lucas, S. A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells / S. Lucas, F. Brasseur, T. Boon // Cancer Research. - 1999. - V. 59. - P. 4100–4103.
153. Luo, B. Structural basis of integrin regulation and signaling / B. Luo, C.V. Carman, T.A. Springer // Annual. Rev. Immun. - 2007. - V 25. - P. 619 – 647.

154. Maas, S. Decreased Fas expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status / S. Maas, U. Warskulat, C. Steinhoff et al. // [Urology](#). - 2004. - V. 63. - № 2. - P. 392-7.
155. Maeurer, M.J. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen / M.J. Maeurer, S.M. Gollin, D. Martin, W. Swaney et al. // *J.Clin. Investig.* - 1996. - V.98. - P.33-41.
156. Malek, T.R. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R-deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2 / T.R. Malek, A. Yu, V. Vincek et al. // *Immunity*. - 2002. - V.17N.2. - P. 167-178.
157. Martelange, V. Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression / V. Martelange, C. De Smet, E. De Plaen et al. // *Cancer Res* - 2000. - V. 60. - P. 48–55.
158. Martin-Kleiner, I. BORIS in human cancers – a review / I. Martin-Kleiner // *Eur. J. Cancer*. - 2012. - V. 48. - № 6. - P. 929–935.
159. Maruo, Y. ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer / Y. Maruo, A. Gochi, A. Kaihara et al. // *Int. J. Cancer*. - 2002. - V. 100. - P. 486-490.
160. Mathieu, M.G. HAGE, a cancer/testis antigen with potential for melanoma immunotherapy: identification of several MHC class I/II HAGE-derived immunogenic peptides / M.G. Mathieu, A.J. Knights, G. Pawelec, C.L. Riley et al. // *Cancer Immunol Immunother.* - 2007. - V. 56. - P. 85-95.
161. Matthias, H The prognostic impact of soluble apoptosis-stimulating fragment on mortality in patients with carotid atherosclerosis. *Stroke* / H. Matthias, R. Koppensteiner, G. Maurer, E. Minar, W. Mlekusch et al.// *a journal of cerebral circulation*. - 2011. - V. 42. - № 9. - P. 65-70.
162. Maureen, A.C. ICAM-1-dependent tuning of memory CD8 T-cell responses following acute infection / A.C. Maureen, R.B. Scott, C.B. Daniel, and J.Z. Allan // *PNAS*. - 2013. - № 4. - P. 1416-1421.

163. Mircken, L. An exon 5-deleted mRNA encodes a functional interleukin 2 receptor alpha-subunit / L. Mircken, V. Moras, L. Hemon et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1991. - V. 180. - № 3. - P. 1390-1395.
164. Mitsumori, K. Chromosome 14q LOH in localized clear cell renal cell carcinoma / K. Mitsumori, J.M. Kittleson, N. Itoh et al. // *J Pathol.* - 2002. - V. 198. - P.110–114.
165. Miyake, M. 5-fluorouracil enhances the antitumor effect of sorafenib and sunitinib in a xenograft model of human renal cell carcinoma / M. Miyake, S. Anai, K. Fujimoto, S. Ohnishi, M. Kuwada et al. // *Oncol Lett.* - 2012. - V. 3. - P. 1195-1202.
166. Miyata, Y. Molecular cloning and characterization of a novel member of the MAP kinase superfamily / Y. Miyata, M. Akashi, E. Nishida // *Genes Cells.* - 1999. - V. 4. - P. 299–309.
167. Mou, D. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells / D. Mou, S. Cail, J. Peng et al. // *British J. of Cancer.* - 2002. - V.86. - P.110-116.
168. Mueller, J. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression / J. Mueller, S., Mahadevaiah P. Park et. al. // *Nature Genetics.* - 2008. - V. 40. - № 6. - P. 794–799.
169. Murakami, S. Serum soluble interleukin-2 receptor in colorectal cancer / S. Murakami, A. Satomi, K. Ishida et al. // *Acta Oncology.* - 1994. - V. 33. - P. 19–21.
170. Muscatelli, F. Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region / F. Muscatelli, A.P. Walker, E. De Plaen et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1995. - V. 92. - P. 4987–4991.
171. Nakagawa, K. XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients / K. Nakagawa, Y. Noguchi, A. Uenaka et al. // *Clin Cancer Res.* - 2005. - V. 11. - P. 496–503.
172. Nakata, B. Serum soluble interleukin-2 receptor level as a prognostic indicator in gastric cancer / B. Nakata, K.H., Chung Y. Kato // *Br. J. Cancer.* - 1998. - V. 77. - № 11. - P. 1820-1824.

173. Nardiello, T. MAGE-A inhibits apoptosis in proliferating multiple myeloma cells / T. Nardiello, A. Mei, A.J. Jungbluth, H.J. Cho // *Clinical & translational science*. - 2012. - V. 5. - № 2. - P. 209-209.
174. Neeper, M.P. Structure function relationships for the IL2 receptor system. III. Tac protein missing amino acids 102 to 173 (exon4) is unable to bind IL2: detection of spliced protein after L cell transfection / M.P. Neeper, L.M. Kuo, M.C. Kiefer, R.J. Robb // *J. Immunol.* - 1987. - V. 138. - № 10. - P. 3532-3538.
175. Neumann, E. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies / E. Neumann, A. Engelsberg, J. Decker, S. Storke, E. Jager, C. Huber and B. Seliger // *Cancer Res.* - 1998. - V. 58. - P. 4090–4095.
176. Nicole, O. Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-Lymphocyte lines transfer in patients with renal cell carcinoma / O. Nicole, D. Gerard, L. Michael, S. Yvette, G. Sonja et al. // *Int. J. Can.* -2005. -V. 117. -P. 256–264.
177. Nonomura, N. Soluble Fas in serum from patients with renal cell carcinoma / N. Nonomura, K. Nishimura, Y. Ono, T. Fukui, Y. Harada, N. Takaha, S. Takahara, A. Okuyama // *Urology.* - 2000. - V. 55. - № 1. - P. 151-5.
178. Oliver, R.T. Unexplained spontaneous regression and alpha-interferon as treatment for metastatic renal carcinoma / R.T. Oliver, A.B. Nethersell and Bottomley J.M. // *Br J Urol.* - 1989. - V. 63. - P. 128–131.
179. Onda, H. Clinical outcome in localized renal cell carcinomas related to immunoexpression of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 antigen, and tumor size / H. Onda, M. Yasuda, A. Serizawa, R.Y. Osamura, N. Kawamura // *Oncol Rep.* - 1999. - V. 6. - № 5. - P. 39-43.
180. Owen-Schaub, L. Soluble Fas and cancer / L. Owen-Schaub // *Clin. Cancer.* - 2001. - V. 7. - P. 1108-1109.
181. Papadopoulos, G.K. RGD sequences in several receptor proteins: novel cell adhesion function of receptors / G.K. Papadopoulos, C. Ouzounis & E. Eliopoulos // *Int. J. Biol. Macromol.* - 1998. - V. 1. - P. 51–57.
182. Papoff, G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor / G.

Papoff, P. Hausler, A. Eramo et al. // J. Biol. Chem. - 1999. - V. 274. - № 53. - P. 241–250.

183. Patrick, J.S. Immune Surveillance Tissue Antigen Profiling in Advanced Ovarian Cancer / J.S. Patrick, K.P. Ronald, V. Girish, S. Payal et al. // Clinical Ovarian & Other Gynecologic Cancer. - 2012. - V. 5. - № 1. - P. 1-44.

184. Pavel, D. The Novelty of Human Cancer/Testis Antigen Encoding Genes in Evolution / D. Pavel, M.S. Ekaterina, A.P. Kozlov // International Journal of Genomics. - 2013. - V. 13 - P. 1-7.

185. Pellat, D.C. The cancer germline genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells / D.C. Pellat, M.P. Mellerin, N. Labarriere, G. Jegou, A. Moreau-Aubry et al. // Eur J Immunol. -2000. - V. 30. - № 3. - P. 803–9.

186. Peter, M.E. Advances in apoptosis research / M.E. Peter, A.E. Heufelder, M.O. Hengartner // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1997. - V. 94. - P.12736-12737.

187. Proussakova, O.V. Oligomerization of soluble Fas antigen induces in cytotoxicity / O.V. Proussakova, N.A. Rabaya, A.B. Moshnikova et al. // J. Biol. Chem. - 2003. - V. 278. - P. 36236-36241.

188. Qiang, S. A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer / S. Qiang, L. Xiaomin, X. Ting, Z. Ju, S. Huiying et al. // Cancer Letters. - 2013. - V. 328. - P. 160–167.

189. Qiu-Yuan, X. Sperm protein 17, MAGE-C1 and NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma: expression frequency and their correlation with clinical parameters / X. Qiu-Yuan, L. Song, L. Fang-Qiu, H. Wen-Bin, S. Li-Ning et al. // Int J Clin Exp Pathol. - 2013. - V. 6. - № 8. - P. 1610-1616.

190. Rayman, P: Tumor-induced dysfunction in interleukin-2 production and interleukin-2 receptor signaling: a mechanism of immune escape / P. Rayman, R.G. Uzzo, V. Kolenko, T. Bloom, M.K. Cathcart, L. Molto, A.C. Novick, R.M. Bukowski et al. // Cancer J Sci Am. - 2000. - V. 6. - № 1. - P. 81-87.

191. Rhind, G.S. Effects of moderate endurance exercise and training on in vitro lymphocyte proliferation, interleukin-2 (IL-2) production, and IL-2 receptor

expression / G.S. Rhind, N.P. Shek, S. Shinkai, J.R. Shephard // Eur. J. Appl. Physiol. - 1996. - V. 74. - № 4. - P. 348-360.

192. Rivellini, L. Quantitative correlation between HLA class I expression and recognition of melanoma cells by antigen specific cytotoxic T lymphocytes / L. Rivellini, D.C. Barracchini, V. Viggiano, Y. Kawakami and S.A. Rosenberg // Cancer Res. - 1995. - V. 55. - P. 3149-3157.

193. Robb, R.J. Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. IV. Analysis of the sequence and ligand-binding properties of soluble Tac-protein / R.J. Robb, R.M. Kutny // J. Immuno. - 1987. - V. 139. - №3. - P. 855-862.

194. Robert, K. Derepression of Cancer/Testis Antigens in cancer is associated with distinct patterns of DNA Hypomethylation / K. Robert, K. Prakash and H. Sridhar // BMC Cancer. - 2013. - V. 13. - P. 144-153.

195. Roser, G. β_2 Integrin-Mediated Crawling on Endothelial ICAM-1 and ICAM-2 Is a Prerequisite for Transcellular Neutrophil Diapedesis across the Inflamed Blood-Brain Barrier / G. Roser, L. Ruth, V. Dietmar, and E. Britta // The Journal of Immunology. - 2014. - V. 192. - № 1. - P. 324-337.

196. Rubin, L.A. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application / L.A. Rubin, D.L. Nelson // Ann. Intern. - 1990. - V. 113. № 8. - P. 619-627.

197. Sabatino, M. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy / M. Sabatino, S. Kim-Schulze, M.C. Panelli et al. // J Clin Oncology. - 2009. - V. 16. - P. 45-52.

198. Sacco, R. Transforming growth factor beta1 and soluble Fas serum levels in hepatocellular carcinoma / R. Sacco, D. Leuci, C. Tortorella et al. // Cytokine. - 2000. - V. 12. - № 6. - P. 811-814.

199. Saldanha-Araujo, F. Cancer/testis antigen expression on mesenchymal stem cells isolated from different tissues / F. Saldanha-Araujo, R. Haddad, D.L. Zanette et al. // Anticancer Research. - 2010. - V. 30. - № 12. - P. 5023-5027.

200. Salman, T. Spontaneous tumor regression / T. Salman, K. C. Izmir // journal of oncological science. - 2016. - V. 2. - P. 1-4.

201. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Frith, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Laboratory Press. - 1989. - V. 7. - P. 480-489.
202. Sardaro, A. Immune Responses To The Cancer Testis Antigen Xage-1b In Non Small Cell Lung Cancer Caucasian Patients / A. Sardaro, K. Saito, E. Nakayma, D. Valmori // Journal pone PLoS ONE. - 2016. - V. 11. - №. 7. - P. 3.
203. Sarquis, M.S. Distinct expression profiles for PTEN transcript and its splice variants in Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome / M.S. Sarquis, S., Agrawal L. Shen et al. // Am. J. Hum. Genet. - 2006. - V. 79. - № 1. - P. 23-30.
204. Sato, A. Topotecan and small interfering RNA suppress survivin expression synergistically in Caki-1 renal cancer cells: Direct suppression of survivin and enhancement of transfection efficiency by topotecan / A. Sato, K. Ito, T. Asano, M. Sumitomo et al. // Intl J of Oncology. - 2008. - V. 32. - P. 171-176.
205. Scanlan, M.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary / M.J. Scanlan, L. Simpson, L. Old // Cancer Immun. - 2004. - V. 4. - P. 1-15.
206. Schmidinger M. Sequential administration of interferon and interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma: results of a Phase II trial. Austrian Renal Cell Carcinoma Study Group / M. Schmidinger, G.G. Steger, C. Wenzel, G.J. Locker et al. // Cancer Immunol. Immunother. - 2000. - V. 49. - P. 395–400.
207. Schulz, O. Der-p I a major allergen of the house dust mite, proteolytically cleaves the low-affinity receptor for human IgE (CD23) / O. Schulz, P. Laing, H.F. Sewell, F. Shakib // Eur. Journal Immunology. - 1995. - V. 25. - P. 3191-3194.
208. Schulze-Osthoff K. The Fas/APO-1 receptor and its deadly ligand / K. Schulze-Osthoff // Trends Cell Biol. - 1994. - V. 4. - P. 421-426.
209. Segal, N. Identification of cancer-testis genes expressed by melanoma and soft tissue sarcoma using bioinformatics / N. Segal, E. Blachere, A. Guevara-Patico et al. // Cancer Immunity. - 2005. - V.5. - P.2-9.
210. Seth, R. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders / R. Seth, F.D. Raymond, M.W. Makgoba // Lancet. - 1991. - V. 1. - № 338. - P. 83.

211. Shan, J. TSP50, a possible protease in human testes, is activated in breast cancer epithelial cells / J. Shan, L. Yuan, Q. Xiao et al. // *Can Res.* - 2002. - V. 62. - P. 90-94.- 239
212. Sharma, S. Epigenetics in cancer / S. Sharma, T.K. Kelly, and P.A. Jones // *Carcinogenesis.* - 2010. - V. 31. - P. 27–36.
213. Sheu, B.C. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma / B.C. Sheu, R.H. Lin, H.N. Ho and S.C. Huang // *Hum. Immunology.* - 1997. - V. 56. - P. 39–48.
214. Sheu, B.C. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression / B.C. Sheu, S.M. Hsu, H.N. Ho et al. // *Cancer Res.* - 2001. - V. 61. - P. 237–242.
215. Sigalotti, L. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine / L. Sigalotti, E. Fratta, S. Coral, S. Tanzarella, R. Danielli et al. // *Cancer Res.* - 2004. - V. 64. - № 24. - P. 9167-71.
216. Sigalotti, L. Cancer Testis Antigens in human melanoma stem cells: expression, distribution and methylation status / L. Sigalotti, A. Covre, S. Zabierowski, B. Himes, F. Colizzi et al. // *Journal Cell Physiology.* - 2008. - V. 215. - № 2. - P. 287–291.
217. Simpson, A.J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer / A.J. Simpson, O.L. Caballero, A. Jungbluth, Y.T. Chen, L.J. Old // *Nat.Rev. Cancer.* - 2005. - V. 5. - № 8. - P. 615-625.
218. Stefanie, R.D. Spontaneous Peripheral T-cell Responses toward the Tumor-Associated Antigen Cyclin D1 in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma / R.D. Stefanie, H. Thomas, B. Ali et al. // *Cancer Immunol Res.* - 2013. - V. 1. - № 5. - P. 60-66.
219. Takashi, M. Serum Levels of Soluble Interleukin-2 Receptor in Renal Cell Carcinoma / M. Takashi, F. Atsuko // *Urology.* - 1998, - V. 51. - № 1. - P. 145–149.
220. Tatsumi, T. MAGE-6 encodes HLA-DRbeta1*0401-presented epitopes recognized by CD4+ T cells from patients with melanoma or renal cell carcinoma / T. Tatsumi, L.S. Kierstead, E. Ranieri, L. Gesualdo, F.P. Schena, J.H. Finke et al. // *Clin Cancer Res.* - 2003. - V. 9. - № 3. - P. 947-54.

221. Van de Stolpe, A. Intercellular adhesion molecule-1 / A. Van de Stolpe, P.T. Van der Saag // J. Mol. Med. - 1996. - V. 74. - P. 13-33.
222. Van den Eynde, B. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T-lymphocytes on a human melanoma / B. Van den Eynde, O. Peeters, O. De Backer, B. Gaugler, T. Boon // J. Exp. Med. - 1995. - V. 182. - P. 689-698.
223. Van der Bruggen, P. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on human melanoma / P., Van der Bruggen C. Traversari, P. Chomez et. al. // Science. - 1991. - V. 254. - P. 1643-1647.
224. Van Parijs, L. Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor / L. Van Parijs, A. Biuckians, A. Ibragimov, F.W. Alt, A.K. Abbas // J Immunol. - 1997. - V. 158. - № 8. - P. 38-45.
225. Van-Spriel, A.B. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation / A.B. Van-Spriel, J.H. Leusen, M. Van Egmond et al. // Blood. - 2001. - V. 97. - № 8. - P. 2478-2486.
226. Vasavada, S.P. P53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma / S.P. Vasavada, A.C. Novick, B.R. Williams // Urology. - 1998. - V. 51. - № 6. - P. 1057-61.
227. Velazquez, E.F. Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM) correlation with prognostic factors / E.F. Velazquez et al. // Cancer Immun. - 2007. - V. 7. - P. 11-13.
228. Vora, D.K. Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster / D.K. Vora, C.L. Rosenbloom, A.L. Beaudet, R.W. Cottingham // Genomics. - 1994. - V. 21. - P. 473-477.
229. Wakao, D. Serum thymidine kinase and soluble interleukin-2 receptor predict recurrence of malignant lymphoma / D. Wakao, I. Murohashi, K. Tominaga et al. // Ann. Hematol. - 2002. - V. 81. - № 3. - P. 140-146.
230. Waldmann, T.A. The interleukin-2 receptor / T.A. Waldmann // J. Biol. Chem. - 1991. - V. 266. - P. 2681-2685.
231. Wang, Q. Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer / Q. Wang, B. Li, B. Liu et al. // J. Exp. Clin. Cancer Res. - 2009. - V. 28. - P. 139-145.

232. Wang, X. Interaction of MAGED1 with nuclear receptors affects circadian clock function / X. Wang, J. Tang, L. Xing et. al. // EMBO J. - 2010. - V. 29. - № 8. - P. 1389–400.
233. Wei, L. Interleukin-2 at the Crossroads Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy / L. Wei, L. Jian-Xin, J. Warren // Immunology Center, USA. - 2013. - V. 38. - № 1. - P. 13–25.
234. Willemijn, H. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with MAGE3, Survivin and B-cell maturation antigen mRNA for vaccination of multiple myeloma patients / H. Willemijn, S. Leonie, M. Frans, F. Hanny, G. Annelies et al. // Cancer Immunol Immunother. - 2013. - V. 62. - P. 1381–1392.
235. Wilson, B.J. The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner / B.J. Wilson, G.J., Bates S.M. Nicol, D.J., Gregory N.D. Perkins // BMC Mol Biol. - 2004. - V. 6. - P. 5–11.
236. Woodfin, A. ICAM-1-expressing neutrophils exhibit enhanced effector functions in murine models of endotoemia / A. Woodfin, M. Beyrau, M. B. Voisin, B. Ma, J. R. Whiteford, P. L. Hordijk, N. Hogg, S. Nourshargh // The American society of hematology: blood. - 2016. - V. 127. - №. 7. - P. 898–908.
237. Wulfken, L.M. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels / L.M. Wulfken, R. Moritz, C. Ohlmann, S. Holdenrieder et al. // Journal Pone. - 2011. - V. 6. - № 9. - P. 80-87.
238. Yamada, M. Regulation of local and metastatic host-mediated anti-tumour mechanisms by L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 / M. Yamada, K. Yanaba, M. Hasegawa, Y. Matsushita // Clin Immunol. - 2006. - V. 143. - № 2. - P. 216–227.
239. Yang, L. Phosphorylations of DEAD box p68 RNA helicase are associated with cancer development and cell proliferation / L. Yang, C. Lin, Z.R. Liu // Mol Cancer Res. - 2005. - V. 3. - P. 355–363.
240. Yang, M. ICAM-1 supresses tumor metastasis by inhibiting macrophage M2 polarization through blockade of eferocytosis / M. Yang, J. Liu, C Piao., J. Shao, J. Du // Cell Death and Disease. - 2015. - V. 6. - P. 2–12.

241. Yang, Y. Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface / Y. Yang, C.D Jun, J. Liu et al. // *Mol. Cell.* - 2004. - V. 14. - P. 269-276.
242. Yao, X. Epigenetic regulation of the taxol resistance-associated gene TRAG-3 in human tumors / X. Yao, J.F. Hu, T. Li, Y. Yang, Z. Sun, G.A. Ulaner et al. // *Cancer Genet Cytogenet.* - 2004. - V. 151. - P. 1–13.
243. Yu, Z. The Cancer/Testis Antigen Prostate-associated Gene 4 (PAGE4) Is a Highly Intrinsically Disordered Protein / Z. Yu, H. Yanan, Y. Fan, M.M Steven., H.G. Robert, O. John and K. Prakah // *J. Biol. Chem.* -2011. - V. 286. - P. 985-994.
244. Zendman, A. The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma / A. Zendman, A. Van Kraats, U. Weidle et al. // *Int. J. Cancer.* - 2002. - V. 99. - P. 361-369.
245. Zhang, J. Clinical study on the expression level of lymphocyte function-related antigen of breast cancer patients / J. Zhang, X. Wu, J. Huang // *Zhongguo Zhong.* 2000. V. 20. № 2. P. 110-112.
246. Zhu, Y. Pancreatic cancer counterattack : MUC4 mediates Fas-independent apoptosis of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte / Y. Zhu, J.J. Zhang, W.B. Liang, Z. Rong, B. Wang, Y. Miao, Z.K. Xu // *Oncology Reports.* - 2014. - V. 31. - P. 1768–1776.
247. Zimmermann, A.K. Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas / A.K. Zimmermann, I. Jochen, A. Klar, C. Renner, D. Korol, D. Fink // *Virchows Arch.* - 2013. - V. 462. - P. 565-574.
248. Zipp, F. Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis / F. Zipp, K. Otzelberger, J. Dichgans et al. // *J Neuroimmunol.* - 1998. - V. 86. - P. 151–154.