

На правах рукописи

ГУРРАМ НАЖИА

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

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2018

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

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор
Доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Новиков Виктор Владимирович
Караулов Александр Викторович

Официальные оппоненты:

Арзумян Вера Георгиевна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», лаборатория физиологии грибов и бактерий, заведующая лабораторией.

Козлов Иван Генрихович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», кафедра фармакологии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «__»_____2018 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10 и на сайте <http://www.gabrich.ru>.

Автореферат разослан «__»_____2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Новикова Л.И

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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 выявлено, 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 тестированных раково-тестикулярных генов. Во многих случаях обнаруживаются мРНК HAGE и TRAG-3.

Впервые установлено, 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 CD95.

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.

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с поставленной целью, для достижения которой были поставлены задачи, сформированы подходы и выбраны средства и методы, определяющие наилучший результат. Анализ научной литературы, посвященной проблеме, проведен на основе формально-логических методов исследования. В работе использованы классические и современные молекулярно-биологические и иммунологические методы исследования.

В работе использовано 37 образцов периферической крови, 27 образцов из опухолевых очагов и 50 образцов сыворотки крови больных раком почки, проходивших стационарное лечение в Приволжском окружном медицинском центре ФМБА (Нижний Новгород) (у 11 из больных были зафиксированы регионарные и отдалённые метастазы); 30 образцов из опухолевых очагов и 29 образцов периферической крови больных раком толстой кишки, проходивших лечение в хирургическом отделении Нижегородской областной клинической

больницы им. Н.А. Семашко (высокая степень дифференцировки опухоли зафиксирована у 3 из всего числа больных раком толстой кишки и низкая – у 3); 30 образцов из опухолевых очагов и 25 образцов периферической крови больных раком легкого, проходивших лечение в Нижегородском областном онкологическом диспансере (у 20 больных диагностирован плоскоклеточный недифференцированный рак легких); 27 образцов из опухолевых очагов и 30 образцов периферической крови больных раком тела матки, проходивших лечение в гинекологическом отделении Приволжского окружного медицинского центра ФМБА (14 образцов гистологически и цитологически соответствуют высокодифференцированной аденокарциноме и 3 – низкодифференцированной аденокарциноме). В качестве контроля использовали 30 образцов периферической крови и 50 образцов сыворотки крови здоровых добровольцев. Исследовали также лизаты клеток перевиваемых линий рака почки A498, SN12C и ACHN, предоставленные Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина.

Выделение суммарной РНК из клеток периферической крови, опухолевых очагов и клеток культуры осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции. Детекцию матричной РНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Визуализацию нуклеиновых кислот осуществляли методом электрофореза в агарозном геле. Определение первичной структуры кДНК осуществляли секвенированием в автоматическом режиме с помощью прибора ABI Prizm 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Сывороточный уровень растворимых форм дифференцировочных молекул CD54, CD25 и CD95 определяли двухсайтовым иммуноферментным методом (В.В. Новиков и др., 2008). Все результаты были получены в трех независимых экспериментах и, в случаях разноречивых результатов, проводили четвертую реакцию ОТ-ПЦР.

Для компьютерного анализа данных в работе использовали пакет программ Lasergene согласно рекомендациям производителя. Анализ первичных структур ДНК и матричной РНК осуществляли с использованием программы MapDraw данного пакета. Сравнение нуклеотидных последовательностей проводили в программе MegAlign. Олигонуклеотидные праймеры конструировали, используя программы PrimerSelect пакета Lasergene и Oligo Calculator v. 10. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 10.0. При анализе качественных и количественных признаков различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлены изменения сывороточного содержания sCD95 при раке почки. При прогрессировании 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 ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», а также в работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Нижегородской области «Городская клиническая больница № 10».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 11 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая часть проведенных нами исследований по анализу транскриптома клеток при раке почки (РП) сосредоточена на анализе транскрипции генов, кодирующих дифференцировочные молекулы иммунной системы человека (ICAM-1 (CD54), IL-2R α (CD25) и Fas (CD95)), непосредственным образом вовлеченные в реализацию иммунного ответа на развитие опухоли. Анализ транскрипции гена, кодирующего молекулу адгезии CD54, показал, что при исследовании частоты экспрессии мембранной и альтернативной форм мРНК ICAM-1 в крови больных РП нами обнаружено у больных присутствие только мРНК, кодирующей мембранную форму ICAM-1. В то же время в опухолевых очагах были найдены как мРНК полноразмерной

мембранной формы, так и альтернативная мРНК ICAM-1, кодирующая белок без трансмембранного домена (CD54TMDel), а также обнаружены статистически значимые различия в частоте их встречаемости (рис. 1). Статистически значимые различия наблюдались и при сравнении частоты выявления данных мРНК у больных с метастазами и больных без метастазов ($p < 0,05$) (табл. 1). При этом мРНК CD54TMDel встречалась только в образцах опухоли с присутствующей мРНК мембранной формы и выявлялась в опухолевых клетках в отсутствие метастазов и только на первой стадии РП (табл. 2). Одним из объяснений нераспознавания антиген-содержащих опухолевых клеток Т-лимфоцитами является недостаточная экспрессия молекул адгезии, в частности, ICAM-1, LFA-1 (А.Ю. Барышников и др., 2003). Экспрессия ICAM-1 коррелирует с инфильтрацией лимфоцитов в очагах воспаления. Умеренная экспрессия ICAM-1 значительна при локализации и уничтожении воспалительных процессов, а ещё для цитолиза вирус-инфицированных и опухолевых клеток (G. Roser et al., 2014). Считается, что индукция ICAM-1 благоприятствует восстановлению иммунного надзора (A. Woodfin et al., 2016).

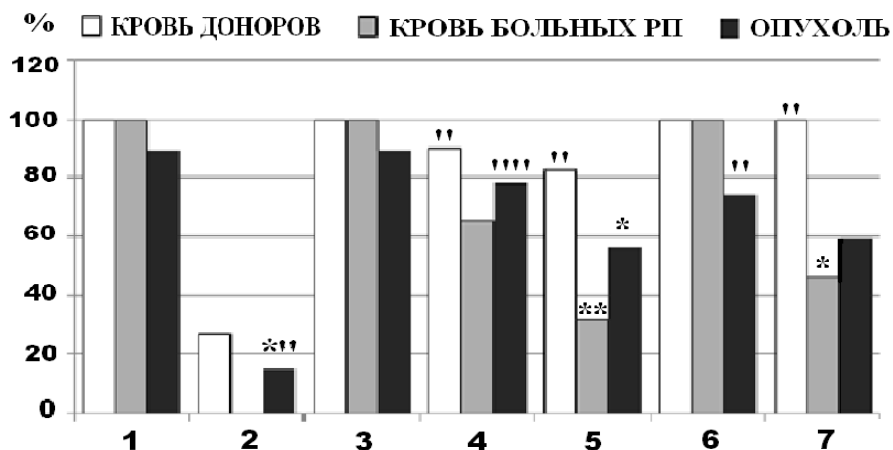


Рисунок. 1. Частота обнаружения различных форм мРНК генов иммунного ответа в крови и в опухолях больных раком почки и у здоровых доноров.

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 ($p < 0,01$), " – в крови больных ($p < 0,05$), "" – мРНК CD54TMDel ($p < 0,001$).

Полученные данные позволяют заключить, что обнаружение мРНК альтернативной формы ICAM-1 в опухолях почки ассоциировано с начальной стадией развития опухоли. 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 (M. Yang et al., 2015; R. Chotirat et al., 2016). Продукт трансляции делетированной формы мРНК ICAM-1 (растворимый белок CD54) может вполне оказаться стимулятором противоопухолевого иммунитета.

Таблица 1 – 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) ^o	26/26 (100) ^o	9/9 (100) ^o	15/18 (83) ^o
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)**,*	4/9 (44)*	11/18 (61)"
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)

Примечание. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с частотой обнаружения:

" – в крови больных; * – мРНК полноразмерной формы; ^o – мРНК делетированной формы;

** – мРНК CD25Exo4Del; "" – у больных с метастазами.

Таблица 2 – Встречаемость разных форм мРНК дифференцировочных генов в крови и клетках опухоли больных раком почки на разных стадиях заболевания (%)

Стадия заболевания	1		2		3		4	
	Опухоль	Кровь	Опухоль	Кровь	Опухоль	Кровь	Опухоль	Кровь
CD54	8/11 (73)	18/18 (100) ^o	7/7(100) ^o	8/8 (100) ^o	5/5(100) ^o	6/6 (100) ^o	4/4 (100) ^o	5/5 (100) ^o
CD54TMDel	4/11 (36)	0/18 (0)	0/7 (0)	0/8 (0)	0/5 (0)	0/6 (0)	0/4 (0)	0/5 (0)
CD25	9/11 (82)	18/18 (100)	6/7 (86)	8/8 (100)	5/5 (100)	6/6 (100)	4/4 (100)	5/5 (100)
CD25Exo4Del	8/11 (73)	9/18 (50)*	6/7 (86)	6/8 (75)	4/5 (80)	5/6 (83)	3/4 (75)	4/5 (80)
CD25Exo4-5Del	5/11 (45)	5/18 (28)*	5/7 (71)	2/8 (25)*	1/5 (20)*	3/6 (50)	1/4 (25)*	2/5 (40)
CD95	9/11 (82)	18/18 (100)	7/7 (100)	8/8 (100)	3/5 (60)	6/6 (100)	1/4 (25)**	5/5 (100)
CD95Exo6Del	7/11 (64)	6/18 (75)*	6/7 (86)	6/8 (75)	2/5 (40)	3/6 (50)	1/4 (25)	2/5 (40)

Примечание. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с частотой выявления мРНК: * – полноразмерной формы; ^o – альтернативной формы; ** – на II-й стадии.

Обнаружено, что при РП в опухолевых очагах и периферической крови больных обнаруживается не только полноразмерная форма мРНК IL-2R α , но и две альтернативные формы – форма мРНК с делецией четвертого экзона, ответственного за связывание IL-2 (CD25Exo4Del), и вариант без экзонов 4 и 5 (CD25Exo4-5Del). В крови больных РП полноразмерная форма мРНК встречалась во всех случаях, а частота детекции обеих альтернативных форм была статистически значимо ниже, чем частота детекции полноразмерной формы мРНК (рис. 1). У здоровых лиц они встречались чаще, чем у больных РП ($p < 0,05$). Сплайсинговая форма мРНК CD25Exo4Del встречалась с более высокой частотой, чем форма, кодирующая CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$) (рис. 1).

В опухолевых очагах частота детекции полноразмерной формы мРНК IL-2R α имела тенденцию к повышению на третьей и четвертой стадиях, достигая 100%-ной встречаемости, в то время как на первых двух стадиях частота встречаемости мРНК полноразмерной формы составляла 82-86% (табл. 2). Соответственно, наличие метастазов во всех случаях сопровождалось присутствием в опухолевом очаге мРНК IL-2R α (табл. 1). Вероятно, это связано с присутствием в микроокружении опухоли T-регуляторов, характеризующихся высокой экспрессией на их мембране CD25. Частота встречаемости мРНК CD25Exo4Del на разных стадиях РП колебалась в пределах 70-80%. В то же время мРНК CD25Exo4-5Del на поздних стадиях детектировалась в 2-3 раза реже, чем на первых двух стадиях. Вероятно, изменения в частоте детекции мРНК CD25Exo4-5Del отражают ее вовлеченность в механизмы иммунорегуляции на начальных стадиях развития опухоли, хотя нельзя исключить присутствие этой формы мРНК в опухолевых клетках, что требует дополнительного изучения.

Появление метастазов сопровождалось тенденцией к повышению в крови больных частоты обнаружения мРНК CD25Exo4Del и статистически значимым увеличением частоты детекции мРНК CD25Exo4-5Del ($p < 0,05$) (табл. 1). В опухолевой ткани наблюдалась противоположная тенденция, приводящая к падению частоты обнаружения альтернативных форм мРНК. Функциональная роль альтернативных вариантов мРНК IL-2R остается неизвестной, однако предполагается, что они участвуют в модуляции работы альфа-цепи рецептора IL-2, с чем, видимо, связаны обнаруженные нами изменения в частоте их детекции.

Молекула Fas (CD95) принимает участие в инициации апоптоза разных типов клеток. Ее мембранная и растворимая формы модулируют апоптотические процессы (O.V. Proussakova, 2003). У больных РП нами обнаружено, что частота встречаемости в крови мРНК, кодирующей полноразмерную форму CD95, составила 100%, что было статистически значимо выше, чем частота детекции формы мРНК CD95Exo6Del, имеющей делецию 6 экзона и кодирующей растворимую молекулу Fas (CD95) (рис. 1). В опухолевых очагах мРНК Fas выявлялась не во всех случаях, делетированная форма обнаруживалась реже, чем полноразмерная (рис. 1).

Частота обнаружения мРНК полноразмерной формы Fas (CD95) в крови больных не менялась от стадии к стадии. При этом частота детекции альтернативного сплайсингового

варианта мРНК CD95Exo6Del по мере прогрессирования заболевания имела тенденцию к снижению (табл. 2). При тестировании опухолей обнаружено снижение частоты выявления как полноразмерной формы мРНК Fas, так и делетированной формы, которая снижалась от стадии к стадии и на последней стадии РП достигала 25% для обеих сплайсинговых форм (табл. 2). Появление у больных РП метастазов также сопровождалось снижением частоты выявления обеих форм мРНК в опухолевых очагах (табл. 1). 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 (табл. 2, табл. 1). На первой стадии частота детекции делетированной мРНК CD95 была статистически значимо ниже, чем частота детекции полноразмерной формы мРНК ($p < 0,05$) (табл. 2). Экспрессия гена, кодирующего молекулу Fas, характерна для многих клеток, в том числе для клеток иммунной системы и опухолевых клеток (С. Liu et al., 1995). Отсутствие изменений в частоте встречаемости мРНК сплайсинговых вариантов в крови по мере прогрессирования заболевания и снижение частоты их детекции в опухолевых очагах позволяет сделать предположение о принадлежности мРНК Fas опухолевым клеткам больных. Известно, что мембранная форма молекулы Fas является инициатором апоптоза, а растворимая форма Fas – его модулятором (В.В. Новиков, А.В. Караулов, А.Ю. Барышников, 2008). Отсутствие экспрессии гена Fas в опухолевых клетках считается одним из механизмов, с помощью которых опухолевые клетки избегают уничтожения по пути Fas-опосредованного апоптоза.

Таким образом, в периферической крови больных РП, а также в опухолевых очагах были выявлены отличия в частоте встречаемости полноразмерных и альтернативных форм мРНК, кодирующих дифференцировочные молекулы ICAM-1 (CD54), IL-2R α (CD25) и Fas (CD95), что отражает особенности транскриптома клеток, циркулирующих в крови, а также клеток опухолевого очага больных РП.

При интегрированном анализе частоты обнаружения мРНК трех ассоциированных с иммунным ответом генов в образцах опухолевых очагов больных РП обнаружено, что мРНК CD25Exo4-5Del обнаруживалась статистически значимо чаще в образцах опухолевых очагов, содержащих CD54TMDel и CD95Exo6Del ($p < 0,05$). То есть, наличие в опухолях сплайсингового варианта мРНК CD25, без 4 и 5 экзонов, чаще сопровождается присутствием укороченных сплайс-вариантов мРНК CD54 и CD95, кодирующих растворимые белки. Кроме того, в присутствии мРНК CD54TMDel или CD25Exo4-5Del статистически значимо часто обнаруживается и полноразмерная форма мРНК CD95 ($p < 0,05$). Таким образом, можно предполагать, что механизмы регуляции синтеза данных продуктов экспрессии генов взаимосвязаны и, вероятно, задействованы в уходе опухоли от иммунного надзора и смерти путем апоптоза.

С целью сравнительного анализа экспрессии генов иммунного ответа и опухолеассоциированных генов проведен анализ частоты встречаемости в крови и опухолевых очагах

матричной РНК 22 наименований раково-тестикулярных генов (cancer testis genes – СТ genes – СТ генов) с последующим сопоставлением спектров и частоты экспрессии мРНК ICAM-1, IL-2R, Fas и мРНК СТ генов. Известно, что индукция экспрессии СТ генов в неопластических клетках является одним из признаков приобретения опухолевыми клетками таких свойств как иммортализация, инвазия и метастазирование (M. F. Gjerstorff et al., 2008). Обнаружение мРНК СТ генов в периферической крови свидетельствует о присутствии в кровяном русле метастазирующих клеток (A. Kaneda et al., 2004; X. Qiu-Yuan et al., 2013). Как правило, экспрессия СТ генов не является опухолеспецифичной. Однако известен ген, который с высокой частотой экспрессируется при РП, в связи с чем назвали его антиген RAGE (RenalAntiGen: антиген, ассоциированный с раком почки) (B. Gaugler et al., 1996).

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) (S. Eichmüller et al., 2002). Были разработаны методы определения альтернативных вариантов мРНК гена RAGE: RAGE-1 и RAGE-4. Показано, что мРНК RAGE-1 выявлялась чаще, чем мРНК RAGE-4 как в образцах крови, так и в образцах опухолей больных РП (табл. 3). Кроме того, мРНК RAGE-1 и RAGE-4 обнаруживались в клетках линий A498, SN12С и ACHN, имеющих происхождение от клеток рака почки.

Таблица 3 – Частота обнаружения альтернативных вариантов мРНК RAGE в крови и в опухоли при онкологических заболеваниях (%)

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

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

Проведен сравнительный анализ частоты детекции мРНК RAGE-1 и RAGE-4 в опухолевых очагах и в крови больных раком почки (РП), легких (РЛ), толстой кишки (РТК) и раком тела матки (РТМ). В крови и опухолевых очагах больных РП мРНК RAGE-1 и RAGE-4 выявляются чаще, чем у больных РТМ, РЛ и РТК (табл. 3). Также показано, что при РТМ присутствие мРНК RAGE наблюдается чаще при низкодифференцированных опухолях, то есть

является неблагоприятным прогностическим маркером. В крови и в образцах опухолевых очагов больных РТК с метастазами наблюдалось достоверное повышение частоты обнаружения обеих форм мРНК RAGE. В то же время мРНК RAGE-4 была выявлена у всех больных с низкодифференцированными опухолями толстой кишки, а при высокой степени дифференцировки мРНК RAGE не обнаруживалась. Интересно, что при РЛ мРНК RAGE-4 не выявлялась ни в одном из 30 тестируемых образцов опухоли, а в крови встречалась в 12% случаев и была связана с плоскоклеточным раком. Необходимо отметить, что оба варианта мРНК RAGE встречались одновременно у всех больных с различными формами опухолей, имеющих отдаленные метастазы в печени. Ранее было показано, что мРНК RAGE гиперэкспрессируется у больных карциномой печени, что связано с плохим прогнозом (J.C. Nyung et al., 2012).

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 протестируемых генов в крови или в опухолях составила 100%, то есть во всех образцах крови и опухолей содержалась хотя бы одна из исследуемых мРНК (рис. 2). Заметим, что в крови здоровых доноров ни в одном случае мРНК СТ генов не детектировалась.

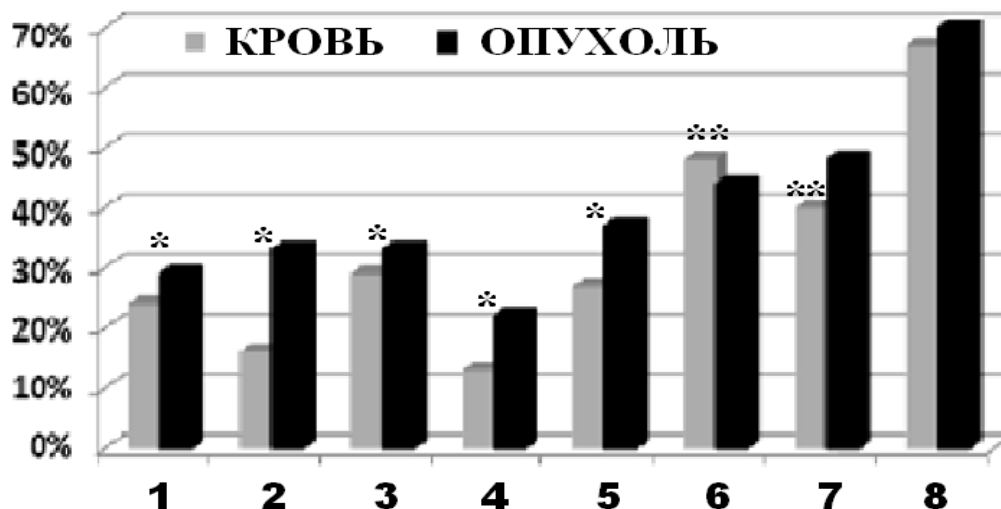


Рисунок 2. Частота выявления мРНК СТ генов в крови и в опухолях больных РП. 1 – MAGE-A(1-6), 2 – MAGE-C1, 3 – XAGE-1a-b, 4 – NY-ESO-1, 5 – GAGE(1-8)-PAGE-1, 6 – TRAG-3, 7 – HAGE, 8 – RAGE-4.

Статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с частотой:

* – обнаружения мРНК RAGE-4; ** – обнаружения мРНК MAGE-C1 и NY-ESO-1.

Как видно из рисунка 2, частота обнаружения в образцах крови и образцах опухоли больных РП мРНК генов MAGE-A(1-6), MAGE-C1, XAGE-1a-b, NY-ESO-1, GAGE(1-8), PAGE-1, TRAG-3, HAGE и RAGE-4 различается. С наибольшей частотой выявляются мРНК RAGE-4, HAGE и TRAG-3, затем идет группа, в состав которой включены мРНК генов GAGE (1-8), PAGE-1 и XAGE-1a-b, реже других выявлялись мРНК генов MAGE-A(1-6), MAGE-C1 и NY-ESO-1. Матричная РНК большинства исследованных СТ генов обнаруживалась в крови больных РП сравнительно реже, чем в образцах опухоли. Однако мРНК TRAG-3 в крови выявлялась чаще, чем в опухоли, что можно объяснить неоднородностью опухолевых очагов, использованных для анализа.

Частота встречаемости мРНК исследованных СТ генов у больных с метастазами и без метастазов различалась. В клетках опухолевых очагов больных с метастазами мРНК генов MAGE-C1, MAGE-A(1-6), NY-ESO-1 и RAGE-4 встречались статистически значимо чаще, чем при их отсутствии ($p < 0,05$). Напротив, частота встречаемости мРНК генов XAGE-1a-b, TRAG-3 и HAGE была выше при отсутствии метастазов ($p < 0,05$).

Заметим, что мРНК исследованных СТ генов присутствовала в крови больных на самых первых стадиях РП, что указывает на возможность использования тестов для диагностики рака на всех стадиях (рис. 3). В качестве особенностей экспрессии отдельных генов можно указать на отсутствие мРНК TRAG-3 и XAGE-1a-b в образцах опухолей больных РП на четвертой стадии, что, видимо, связано с функциональной значимостью этих генов для ранних стадий.

У пациентов первой и второй стадии РП во всех образцах опухоли отсутствовала мРНК NY-ESO-1, на первой стадии отсутствовала также мРНК MAGE-C1, однако они обнаруживались на всех стадиях в крови больных, что видимо было связано с гетерогенностью опухолей (рис. 3). Матричная РНК RAGE-4 и ряда других генов была выявлена в крови и опухолях на всех стадиях РП. У больных на ранних стадиях РП в опухолевых очагах чаще обнаруживались мРНК XAGE-1a-b и TRAG-3. На поздних стадиях в клетках опухоли и в крови обнаруживались мРНК RAGE-4, MAGE-C1, NY-ESO-1, GAGE(1-8)-PAGE-1 и MAGE-A(1-6) (рис. 3).

Результаты сопоставления особенности экспрессии генов, вовлеченных в иммунный ответ, с особенностями транскриптома опухолевых клеток, экспрессирующих раково-тестикулярные гены, показали, что 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. Наличие мРНК TRAG-3, которое наблюдалось на 1-3 стадиях РП в опухолевых очагах, сопровождалось высокой частотой встречаемости полноразмерной формы мРНК Fas. Это указывает на возможную положительную регуляторную роль TRAG-3 в экспрессии гена Fas и в определении чувствительности опухолевых клеток к Fas-зависимому апоптозу.

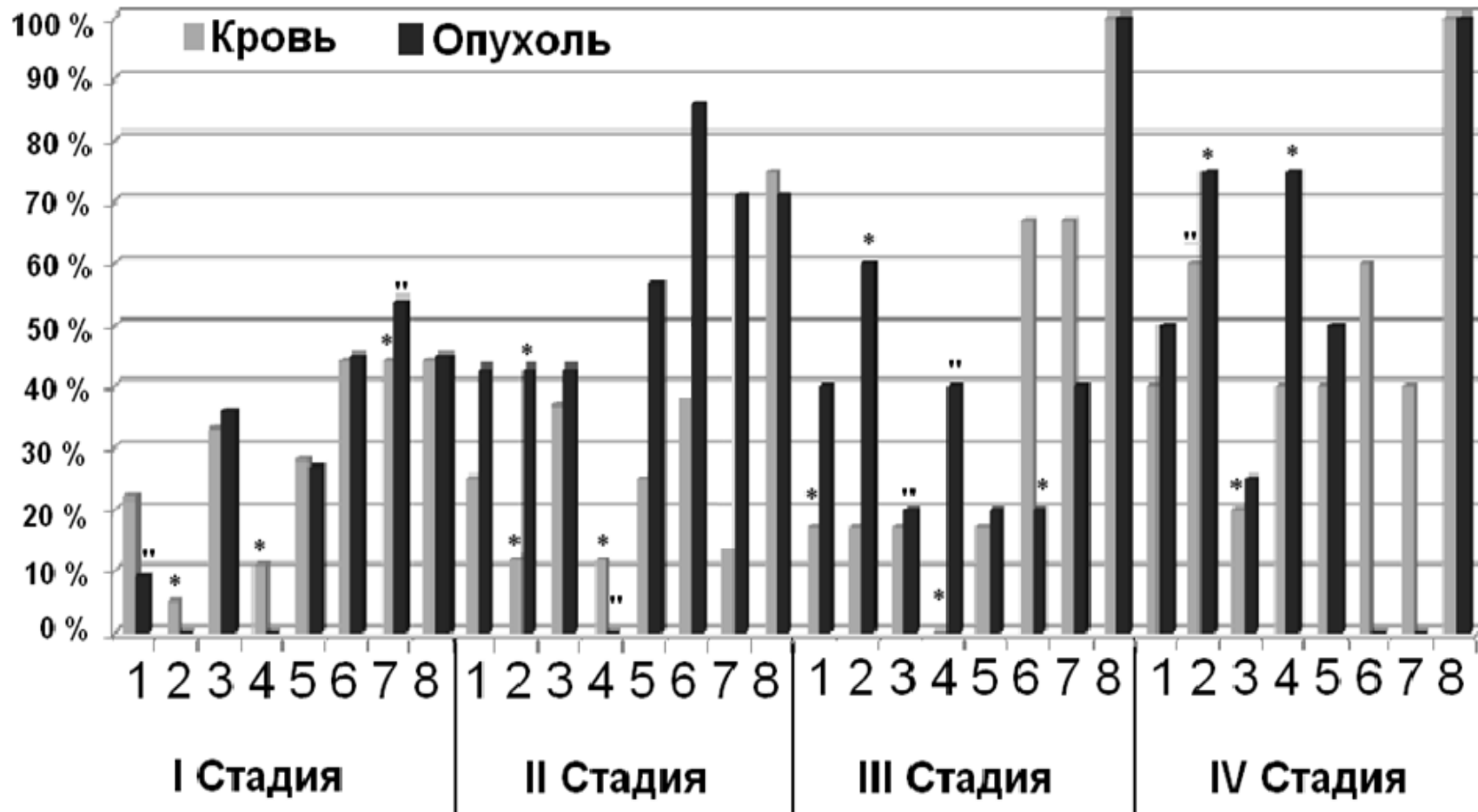


Рисунок. 3. Индивидуальная частота обнаружения мРНК СТ генов в образцах крови и в опухолевых очагах на разных стадиях рака почки.

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.

Статистически значимые различия ($p < 0,05$) в частоте обнаружения: * – мРНК СТ генов на разных стадиях рака почки; " – разных мРНК СТ генов на каждой стадии рака почки.

Делетированная форма мРНК ICAM-1 чаще обнаруживалась в опухолевых очагах больных раком почки, не содержащих RAGE-4, и у пациентов, не имеющих метастазов. Делетированная форма мРНК CD25Exo4Del чаще обнаруживалась в образцах, не содержащих маркер неблагоприятного прогноза заболевания – мРНК NY-ESO-1. То есть, высокая частота встречаемости была характерна для мРНК NY-ESO-1 во всех образцах опухолевых очагов, в которых не выявлялась мРНК CD25 или CD25Exo4Del. Наличие мРНК CD54TMDel и мРНК CD25Exo4Del характерно для ранних стадий опухоли. По-видимому, образование альтернативных форм мРНК ICAM-1 с делецией в области, кодирующей трансмембранную часть белка, или мРНК CD25 с делецией области, отвечающей за связывание интерлейкина-2, является компенсаторным механизмом, ограничивающим гиперэкспрессию функциональных белков ICAM-1 и IL-2R α на поверхности опухолевой клетки.

Обнаружено, что транскриптом клеток опухолевых очагов, характеризующийся отсутствием мРНК RAGE-1, статистически значимо чаще содержал мРНК полноразмерной формы CD95 и альтернативных форм CD54 и CD95 ($p < 0,05$). Известно, что ингибирование экспрессии RAGE-1 малыми интерферирующими РНК (siRNA) достоверно снижает инвазивную способность клеток карциномы печени и в то же время уменьшает экспрессию и активность матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9). Более того, показано, что одновременная высокая экспрессия RAGE-1 и MMP-9 коррелирует с плохим прогнозом для пациентов. Кроме того, siRNA-опосредованный нокдаун RAGE-1 в клеточных линиях карциномы печени SK-HEP1 приводил к подавлению инвазивности этих клеток путем регулирования экспрессии и ферментативной активности MMP-9 (J.C. Hyung et al., 2012). Известно также, что протеолитическая активность MMP-9 приводит к расщеплению среди других ICAM-1 и IL-2R α с образованием растворимых форм и подавляет пролиферативную способность Т-клеток (B.C. Sheu et al., 2001; E. Fiore et al., 2002). Это указывает на роль MMP-9 и, следовательно, RAGE-1 в иммуносупрессии, инвазии опухолевых клеток, и метастазировании.

Растворимые формы дифференцировочных молекул клеток иммунной системы обладают иммунорегуляторными свойствами. Они выполняют функции ограничителей или активаторов иммунных реакций, участвуя в передаче активационных сигналов. Кроме того, при различных заболеваниях сывороточный уровень растворимых дифференцировочных молекул служит мониторинговым показателем течения патологического процесса (В.В. Новиков и др., 2008). Проведенное нами изучение сывороточного содержания растворимых молекул CD54, CD25 и CD95 в сыворотке крови больных раком почки показало значительное повышение содержания молекул CD95 по сравнению с нормой. Различия были зарегистрированы на разных стадиях опухолевого процесса для всех исследуемых молекул, так что прогрессия заболевания сопровождалась еще более выраженным подъемом сывороточного уровня растворимых форм исследованных белков (табл.4).

Таблица 4 – Содержание растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови больных раком почки в целом и 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 ($p < 0,05$) в сравнении: * – с нормой;

" – с I-й стадией; ^ – с III-й стадией.

Содержание растворимых молекул CD54 уже на первой и второй стадиях значительно превышало норму ($p < 0,05$) (табл.4). При отсутствии в опухолевых очагах мРНК альтернативной формы ICAM-1 увеличение сывороточного содержания ICAM-1 может происходить с наибольшей вероятностью только за счет протеолитического шеддинга мембранного ICAM-1. Это значит, что растворимый ICAM-1, образующийся в результате альтернативного сплайсинга в опухолевых клетках, не оказывает влияния на общую концентрацию молекул ICAM-1 в периферическом кровотоке. Повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD54 за счет понижения экспрессии мембранного CD54 эффекторных Т-лимфоцитов (шеддинг) может приводить к ослаблению цитотоксической функции Т-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. Кроме того, растворимые молекулы CD54 могут прямо взаимодействовать с лигандами мембранного ICAM-1 и тем самым прямым образом блокировать межклеточные взаимодействия и способствовать уходу опухоли от иммунологического надзора (J. Zhang et al., 2000; A.V. Van-Spriel et al., 2001).

Нарушение баланса между мембранными и растворимыми формами молекул адгезии может вносить свой вклад в развитие опухоли. 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 (В.В. Новиков и др., 2008). В связи с этим повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD25 у больных раком почки является отражением угнетения противоопухолевого иммунного ответа и маркером плохого прогноза и агрессивности заболевания (табл.4). Гиперпродукция растворимой формы CD25 характерна для поздних стадий развития онкологических заболеваний и является признаком

неблагоприятного прогноза (M. Takashi et al., 1998). Полученные нами результаты подтверждают данные других авторов.

Повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD25 у больных раком почки зарегистрировано при прогрессии заболевания (табл.4), 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 растворимых молекул CD95, отражающий активацию Fas-опосредованного апоптоза у больных раком почки, оказался статистически значимым по сравнению с нормой (табл.4). Также зарегистрирована тенденция к повышению от первой к третьей стадии, но статистически значимыми были различия между второй и первой стадиями ($p < 0,05$) (табл.4). Значимых различий уровней растворимых молекул CD95 у пациентов с выявленными в опухолях различными формами мРНК CD95 обнаружено не было. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что высокий сывороточный уровень растворимых молекул CD95 не является производным опухоли, а отражает иммунный ответ на опухолевую нагрузку. Наши данные согласуются с результатами других авторов, заключивших, что сывороточный уровень растворимых молекул CD95 может составлять эффективный индикатор опухолевой нагрузки у пациентов с РП (N. Nonomura et al., 2000).

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 при раке почки.

ВЫВОДЫ

1. В опухолевых очагах и крови больных раком почки обнаруживаются альтернативные формы мРНК ICAM-1, IL-2R α и Fas. Делетированная форма мРНК ICAM-1, кодирующая белок без трансмембранного домена, выявляется в опухолевых клетках только при отсутствии метастазов. Присутствие делетированной формы мРНК IL-2R α (CD25Exo4-5Del) чаще обнаруживается на ранних стадиях развития рака почки.

2. При раке почки альтернативные варианты мРНК RAGE встречаются чаще, чем при раке толстой кишки, тела матки и раке легких. В опухолях легких наблюдается редкая экспрессия мРНК RAGE-1 и отсутствие мРНК RAGE-4. Присутствие мРНК RAGE сочетается с прогрессией стадий опухоли, с метастатическим и агрессивным потенциалом, а также с низкокодифференцированными опухолями.

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

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 мРНК RAGE-1. Форма CD25Exo4-5Del детектируется чаще совместно с мРНК CD54TMDel и CD95Exo6Del. Альтернативная форма CD54TMDel также обнаруживается чаще в опухолевых очагах рака почки, 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 рака почки, тест на определение мРНК данной группы генов может быть применен для диагностики рака почки.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшим развитием работы является определение при раке почки различий в молекулярных и клеточных механизмах иммунного ответа, связанных с вариабельностью транскриптома опухолевых клеток, в том числе на уровне альтернативного сплайсинга генов ICAM-1, IL-2R α и FAS. Результаты работы предполагают возможность создания метода ранней

диагностики рака почки и других онкологических заболеваний с использованием мультиплексного теста на определение в крови мРНК раково-тестикулярных генов. Важной задачей является количественная оценка продуктов альтернативного сплайсинга генов, кодирующих молекулы Fas, IL-2R α , ICAM-1, и других генов, участвующих в реализации основных звеньев противоопухолевого иммунного ответа, во взаимосвязи с экспрессией раково-тестикулярных генов. Полученные в работе данные служат основой для разработки мониторинговых тестов, сочетающих определение молекулярно-иммунологических и молекулярно-онкологических показателей, применимых для контроля эффективности лечения рака почки, в том числе с использованием терапевтических моноклональных антител.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гуррам, Н. мРНК раковотестикулярных антигенов у больных раком почки / Н. Гуррам, Д.В. Новиков, К.В. Березин, Т.В. Белова, А.В. Калугин, А.В. Алясова, В.В. Новиков // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9. – № 2. – С. 51.

2. Гуррам Н. Матричная РНК раково-тестикулярных антигенов в крови и опухолевых очагах больных раком почки / Н. Гуррам, Д.В. Новиков, К.В. Березин, Т.В. Белова, А.В. Калугин // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010», Н. Новгород. – 2010. – С. 92.

3. Белова, Т.В. Встречаемость мРНК раково-тестикулярных генов у больных раком толстого кишечника до и после резекции опухоли / Т.В. Белова, Д.В. Новиков, А.В. Калугин, Н. Гуррам, А.В. Алясова, В.В. Новиков // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Н. Новгород. – 2010. – Т. 2. – № 2. – С. 486-489.

4. Гуррам, Н. Сравнение экспрессии гена RAGE и других раково-тестикулярных генов в крови и опухолевых очагах больных раком почки / Н. Гуррам, Д.В. Новиков, Е.С. Плеханова, А.В. Калугин, А.В. Алясова, В.В. Новиков, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – № 2. – С. 15.

5. Плеханова, Е.С. Экспрессия раково-тестикулярных генов в клетках перевиваемых линий / Е.С. Плеханова, Н. Гуррам, Д.В. Новиков, А.В. Калугин, С.В. Шумилова, Е.Н. Филатова, В.В. Новиков, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – № 2. – С. 40.

6. Гуррам, Н. Экспрессия раково-тестикулярных генов у больных раком почки / Н. Гуррам, Д.В. Новиков, А.В. Алясова, В.В. Новиков // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Н. Новгород. – 2012. – Т. 2. – № 3. – С. 183-186.

7. Калугин, А.В. Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в клетках опухолевых очагов и крови больных миомой матки / А.В. Калугин, Д.В. Новиков, Е.Ю. Конторщикова, Е.С. Плеханова, А.А. Щербинина, Н. Гуррам, А.В. Целикова, В.В. Новиков // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – Т. 2. – № 3. – С. 196-200.

8. Гуррам, Н. Альтернативные формы мРНК ICAM-1 И растворимый ICAM-1 у больных раком почки / Н. Гуррам, Д.В. Новиков, Н.Б. Преснякова, А.В. Алясова, В.В. Новиков // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 12. – № 2. – С. 25.

9. Калугин, А.В. Повышение частоты обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов В периферической крови при прогрессии инфильтративного роста рака тела матки / А.В. Калугин, Д.В. Новиков, Е.Ю. Конторщикова, К.А. Шахова, А.В. целикова, Н. Гуррам, Е.С. Плеханова, А.А. Щербинина, В.В. Новиков // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 12. – № 2. – С. 39.

10. Гуррам, Н. Альтернативные формы мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (CD25) и его сывороточный уровень у больных раком почки / Н. Гуррам, Я. Хаффарессас, Д.В. Новиков, Н.Б. Преснякова, А.В. Алясова, В.В. Новиков //Актуальные вопросы современной науки. Новосибирск. – 2013. – В. 27. – №6. – С.12-21.

11. Гуррам, Н. Альтернативные формы мРНК альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (CD25) и его сывороточный уровень у больных раком почки / Н. Гуррам, Д.В. Новиков, Н.Б. Преснякова, А.В. Алясова //Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т 7. – № 2-3. – С. 16.

12. Гуррам, Н. Сывороточное содержание растворимых форм дифференцировочных антигенов клеток иммунной системы до и после резекции опухоли почек / Н. Гуррам, Я. Хаффарессас, Д.В. Новиков, А.В. Алясова, В.В. Новиков // Российский аллергологический журнал. – 2016. – Т. 2. – № 3. – С. 68-69.

13. Гуррам, Н. Сравнительный анализ раково-тестикулярных генов у больных раком почки / Н. Гуррам, А.В. Калугин, Я. Хаффарессас, Д.В. Новиков, В.В. Новиков. // Сборник тезисов II Петербургского Онкологического Форума с международным участием. С-Петербург. – 2016. – С. 253.

14. Гуррам, Н. Присутствие альтернативных вариантов мРНК RAGE в клетках перевиваемых клеточных линий человека / Н. Гуррам, А.В. Калугин, Я. Хаффарессас, Д.В. Новиков, В.В. Новиков // Сборник тезисов II Петербургского Онкологического Форума с международным участием. С-Петербург. – 2016. – С. 254.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция
РЛ	Рак легких
РП	Рак почки
РТК	Рак толстой кишки
РТМ	Рак тела матки
СТ genes	Cancer testis genes (раково-тестикулярные гены)
Fas (CD95)	Фрагмент, стимулирующий апоптоз
HAGE	Helical AntiGene (антиген, обладающий хеликаза-подобным действием)
GAGE	G melanoma associated gene (ген G, ассоциированный с меланомой)
ICAM-1 (CD54)	Молекула межклеточной адгезии-1
IL-2R α (CD25)	Альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2
MAGE	Melanoma AntiGene (антиген, ассоциированный с меланомой)
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9 (матриксная металлопептидаза 9)
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma (плоскоклеточная карцинома пищевода, Нью-Йорк)
PAGE	Prostate Associated Gene (ген, ассоциированный с простатой)
RAGE	RenalAntiGen (антиген, ассоциированный с раком почки)
TRAG-3	Taxol Resistance-Associated Gene-3 (ген 3, ассоциированный с резистентностью к таксолу)
XAGE	X associated gene (ген, ассоциированный с X хромосомой)