

УДК: 616.61-006.6:577.2

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, ФАКТОРА РОСТА VEGF, ЕГО РЕЦЕПТОРА, ПРОТЕИНКИНАЗЫ m-TOR И АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ У БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ ПОЧКИ

З.А. Юрмазов¹, Е.А. Усынин¹, Л.В. Спирина^{1,2},
И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}

Томский НИИ онкологии, г. Томск¹

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Томск²
634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: SpirinaLV@oncology.tomsk.ru¹

Аннотация

Введение. Поиск дополнительных информативных прогностических параметров у больных раком почки является актуальной задачей современной онкологии. **Цель исследования.** Изучение прогностической значимости экспрессии транскрипционных факторов, фактора роста VEGF, его рецептора, протеинкиназы m-TOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки в соотношении со шкалой MSKCC. **Материал и методы.** В исследование было включено 40 пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком (T₃₋₄N₀₋₁M₁). Согласно шкале MSKCC все больные были распределены на 3 группы: с хорошим (n=13), промежуточным (n=26) и неблагоприятным прогнозом (n=1). В дальнейшем анализ касался больных, имеющих хороший и промежуточный прогноз (n=39). Всем пациентам на первом этапе проводилась таргетная терапия pazopanibом или эверолимусом, после которой выполнялась паллиативная нефрэктомия. Содержание транскрипционных и ростовых факторов изучено методом ИФА; активность протеасом и кальпаинов – с помощью флюорометрического метода. **Результаты.** Исходно высокие уровни экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 и ростового фактора VEGF в опухоли почки ассоциированы с хорошим прогнозом заболевания по шкале MSKCC. У этой категории больных на фоне лечения наблюдалось снижение экспрессии транскрипционных факторов HIF-1, NF-κB p65, NF-κB p50, ростового фактора VEGF и активности протеасом. Выявленное повышение активности кальпаинов у больных с промежуточным прогнозом было ассоциировано с прогрессированием заболевания. **Заключение.** Выделены дополнительные молекулярные показатели, повышающие информативность шкалы MSKCC, что позволяет с большей точностью предсказать возможный исход заболевания у больных метастатическим раком почки.

Ключевые слова: диссеминированный рак почки, NF-κB, HIF-1, VEGF, протеасомы, кальпаины, прогноз.

Рак почки представляет собой гетерогенную группу опухолей, из которых более 75 % приходится на светлоклеточный почечно-клеточный тип [14], связанный с мутационными изменениями белка фон Хиппель-Линдау, увеличением содержания ядерного фактора HIF-1, гиперэкспрессией эндотелиального фактора роста (VEGF), активацией тирозинкиназных путей [16] и ключевой серин-треониновой протеинкиназой TOR (m-TOR) [9]. Это позволяет рассматривать данные молекулярные маркеры в качестве основных мишеней. Помимо этого, в патогенезе рака почки важную роль играет фактор транскрипции NF-κB (nuclear factor kappa-B), который вовлечен в апоптоз и пролиферацию опухолевых клеток [12].

Одним из механизмов регуляции содержания транскрипционных факторов NF-κB и HIF-1α является внутриклеточный протеолиз, осуществляемый протеиназами, к числу которых относят протеасомы и кальпаины [1, 2, 4, 18]. В литературе представлены данные о том, что снижение деградации HIF-1α при использовании ингибиторов протеиназ или гипоксии приводит к значительному повышению экспрессии VEGF в опухолевых клетках [20]. Активация транскрипционного фактора NF-κB также осуществляется при участии протеасом [13]. Показана связь экспрессии транскрипционных факторов NF-κB, HIF-1 и ростового фактора VEGF с активностью и субъединичным составом протеасом у больных раком почки при развитии

гематогенных метастазов [3, 4]. Кроме этого, на культуре почечно-клеточного рака (ПКР) выявлено влияние протеасом на содержание активных компонентов m-TOR сигнального пути [19].

При определении тактики лечения больных метастатическим почечно-клеточным раком значимую роль играют факторы прогноза – патоморфологические и клинико-лабораторные показатели, входящие в состав ряда прогностических шкал (прогностическая модель ECOG, номограмма Kattan, шкалы Motzer и HENG) [11, 15]. Наиболее известной и широко используемой для прогнозирования течения заболевания является шкала, разработанная в Мемориальном онкологическом центре Слоан-Кеттеринг MSKCC (МОЦСК/MSKCC), которая включает в себя такие параметры, как соматический статус больного по шкале Карновского, уровень ЛДГ, концентрация скорректированного кальция в сыворотке крови, уровень гемоглобина и наличие в анамнезе нефрэктомии.

Однако далеко не всегда этой информации бывает достаточно для прогноза заболевания, что обусловлено сложными механизмами патогенеза рака почки, поэтому ведется непрерывный поиск дополнительных информативных прогностических параметров [10, 18]. Примером таких исследований может служить шкала Heng, в которую кроме критериев MSKCC были включены такие лабораторные показатели, как количество тромбоцитов и нейтрофилов [7, 11].

Целью исследования явилось изучение прогностической значимости экспрессии транскрипционных факторов, фактора роста VEGF, его

рецептора, протеинкиназы m-TOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным ПКР и соотношение их со шкалой MSKCC.

Материал и методы

В исследование включено 40 больных (табл. 1) с метастатическим морфологически верифицированным почечно-клеточным раком $T_{3-4}N_{0-1}M_1$ стадий, получавших лечение в отделении общей онкологии Томского НИИ онкологии в период с 2010 по 2013 г. Из них 25 мужчин и 15 женщин. На первом этапе пациентам в течение 2 мес проводилась таргетная терапия препаратами pazopanib (n=26) по 800 мг или everolimus (n=14) в дозе 10 мг ежедневно.

Разделение больных на группы согласно шкале MSKCC. В зависимости от прогноза заболевания были выделены группы больных с благоприятным, промежуточным и плохим прогнозом. Оценка проводилась по 5 независимым параметрам. Неблагоприятными факторами считали: статус по шкале Карновского <80 %, уровень лактатдегидрогеназы в 1,5 раза выше нормы, скорректированный кальций крови >10 мг/дл, уровень гемоглобина <130 г/л и отсутствие в анамнезе нефрэктомии. В группу благоприятного прогноза вошли пациенты (n=13), у которых не было ни одного из вышеперечисленных факторов, промежуточного (n=26) – при наличии одного или двух факторов, и неблагоприятного (n=1) – при наличии трех факторов и более [15]. В дальнейшем анализ касался больных, имеющих хороший и промежуточный прогноз (n=39). После

Таблица 1

Клиническая характеристика больных, получавших pazopanib и everolimus в предоперационном режиме

Показатель	Пазопаниб	Эверолимус
	Кол-во больных	Кол-во больных
Пол		
Мужчины	16 (61,5 %)	9 (64,3 %)
Женщины	10 (38,5 %)	5 (35,7 %)
Средний возраст (мин-макс), лет	56 ± 2,5 (48–73)	54 ± 1,8 (46–70)
Местная распространенность		
T ₁	6 (23,1 %)	2 (14,3 %)
T ₂	10 (38,5 %)	8 (57,1 %)
T ₃	5 (19,2 %)	3 (21,4 %)
T ₄	5 (19,2 %)	1 (7,1 %)
Поражение регионарных л/узлов		
N ₀	19 (73,1 %)	9 (64,3 %)
N ₁	7 (26,9 %)	5 (35,7 %)
Метастазы		
В легкие	20 (76,9 %)	9 (64,3 %)
В кости	11 (42,3 %)	7 (50,0 %)
В печень	2 (7,6 %)	1 (7,1 %)
В контралатеральный надпочечник	1 (3,8 %)	1 (7,1 %)
В другие органы	2 (7,6 %)	-

окончания курса предоперационного лечения проводилась паллиативная нефрэктомия.

Материалом для исследования явились образцы опухолевой ткани, полученные при выполнении диагностической биопсии и радикального оперативного вмешательства, которые после забора замораживались и хранились при температуре -80°C .

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-HCl буфера (pH=7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и 4°C .

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную активность тотального пула протеасом определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизмененных тканей, а также во фракциях протеасом, по гидролизу флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin, утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеасом [6], на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Реакционная смесь содержала 20 мМ трис-HCl (pH=7,5), 1 мМ дитиотреитола, 30 мкМ N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin, 5 мМ хлорида магния и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин и останавливали 1 % додецил сульфатом натрия. Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом – MG132. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Определение активности кальпаинов. Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах тканей по методу Sandmann [17]. В качестве субстрата использовали тот же флуорогенный олигопептид N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin, который был использован для определения активности протеасом. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-HCl (pH 7,3), 145 мМ NaCl. Реакцию проводили, добавляя к 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, растворенному в реакционной смеси, 5 мкл супернатанта, и инкубируя при 25°C в течение 30 мин в присутствии или отсутствии 10 мМ CaCl_2 и 0,4 мкМ ингибитора N-ацетил-Leu-Leu-норлейцинал (Sigma) [5].

Определение содержания p-m-TOR, VEGF, VEGFR2, HIF-1 α , NF- κ Bp50 и NF- κ Bp65. Образцы осветленных гомогенатов опухолей использовались для определения содержания VEGF, VEGFR2, p-m-TOR (R&D Systems, DSL, США), HIF-1 α , NF- κ B p50 и NF- κ B p65 субъединиц (Caymanchem, США) методом твердофазного иммуноферментного анализа на ИФА-анализаторе Anthos 2020. Приготовление и очистка ядерных экстрактов

тканевого гомогената проводились в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя наборов. Уровень белка в гомогенатах и ядерных экстрактах определяли по методу Лоури. Результаты определения содержания VEGF, VEGFR2, phospho-TOR выражали в пг/мг белка, а HIF-1 α , NF κ B p50 и NF κ B p65 – в условных единицах на мг белка в лунке.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 8.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего, или как медиана с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий исследовали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни.

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом Томского НИИ онкологии.

Результаты исследования и обсуждение

Данные, характеризующие исходный уровень транскрипционных факторов, а также динамика их изменения на фоне лечения таргетными препаратами у больных с хорошим и промежуточным прогнозом заболевания по шкале MSKCC представлены в табл. 2.

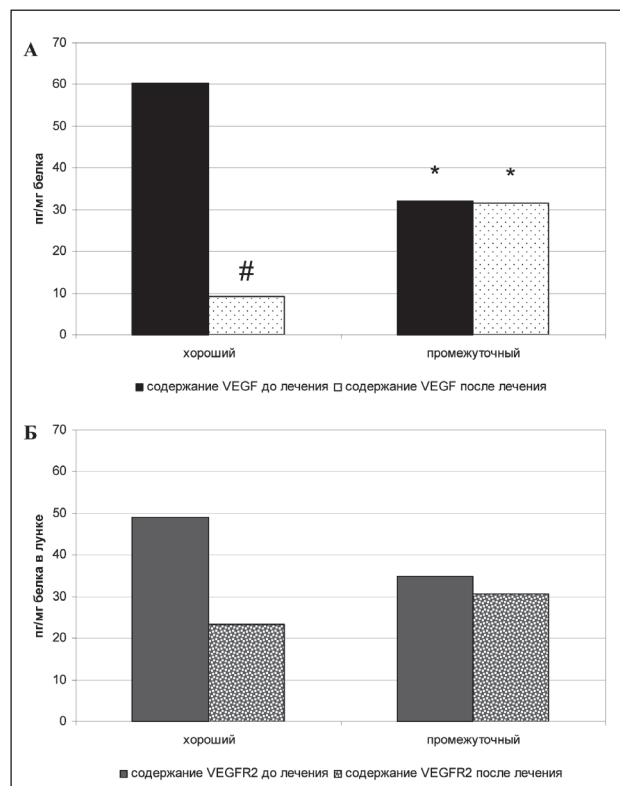


Рис. 1. Содержание ростового фактора VEGF (А) и его рецептора VEGFR2 (Б) в опухоли больных раком почки в зависимости от шкалы MSKCC и этапа лечения. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных с хорошим прогнозом ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных до лечения ($p < 0,05$)

Таблица 2

Экспрессия транскрипционных факторов NF-κB p65, NF-κB p50 и HIF-1α в опухоли больных раком почки в зависимости от шкалы MSKCC и этапа лечения

Прогноз по шкале MSKCC	Содержание NF-κB p65, УЕ/мг белка в лунке		Содержание NF-κB p50, УЕ/мг белка в лунке		Экспрессия HIF-1α, УЕ/мг белка в лунке	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Хороший	20,8 (9,8–37,0)	4,6 (3,96–4,84)#	24,7 (9,8–42,6)	4,0 (3,34–4,9)#	13,08 (6,2–20,5)	1,11 (0,34–1,98)#
Промежуточный	17,9 (6,3–23,0)	9,0 (3,98–16,46)#	10,8 (6,0–32,5)	6,33 (4,0–12,1)	6,35 (3,2–12,7)*	1,0 (0,26–3,6)

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных с хорошим прогнозом ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных до лечения ($p < 0,05$).

Таблица 3

Содержание протеинкиназы p-m-TOR в опухоли больных раком почки в зависимости от шкалы MSKCC и этапа лечения

Прогноз по шкале MSKCC	Содержание p-m-TOR, пг/мг белка в лунке	
	До лечения	После лечения
Хороший	13,9 (0,0–20,0)	6,65 (2,15–7,89)#
Промежуточный	12,5 (0–14,3)	15,84 (1,58–21,8)*

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных с хорошим прогнозом ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с показателями до лечения ($p < 0,05$).

Выявлена исходно высокая экспрессия ядерных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50 в опухоли больных обеих групп до начала лечения. В отличие от этих молекулярных показателей уровень транскрипционного фактора HIF-1α различался в зависимости от прогноза заболевания по шкале MSKCC. Так, исходная экспрессия ядерного фактора в ткани опухоли у пациентов с хорошим прогнозом была в 2 раза выше по сравнению с больными, у которых прогноз был определен как промежуточный.

На фоне проведенной таргетной терапии у больных как с благоприятным, так и промежуточным прогнозом уменьшался уровень NF-κB p65. Наиболее существенное снижение этих показателей (в 4,5 раза после приема таргетных препаратов) наблюдалось только у больных с хорошим прогнозом по шкале MSKCC. У этих же пациентов отмечено и снижение уровня транскрипционных факторов NF-κB p50 и HIF-1α – в 6,1 и 11,8 раза соответственно, в то время как у пациентов с промежуточным прогнозом таких изменений не отмечалось.

Аналогичные данные были получены и в отношении протеинкиназы p-m-TOR. Ее уровень снижался на фоне лечения у больных с хорошим прогнозом в 2 раза и оставался практически равным исходному у пациентов с промежуточным прогнозом (табл. 3).

Содержание ростового фактора VEGF и его рецептора в опухоли больных диссеминированным ПКР в зависимости от прогноза заболевания по шкале MSKCC и этапа лечения представлено на рис. 1. Зафиксирован исходно высокий уровень изучаемого параметра у больных с хорошим прогнозом, который снижался в 6,5 раза на фоне приема таргетных препаратов, тогда как у больных с

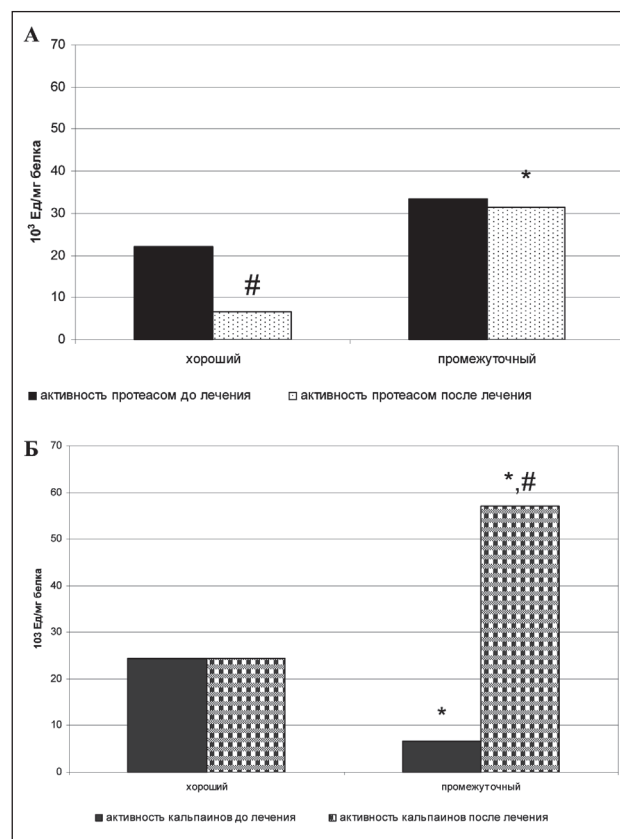


Рис. 2. Активность внутриклеточных протеиназ: протеасом (А), кальпаинов (Б) в опухоли больных раком почки в зависимости от шкалы MSKCC и этапа лечения. Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных с хорошим прогнозом ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с показателями у больных до лечения ($p < 0,05$).

промежуточным прогнозом подобной динамики не отмечалось. Экспрессия рецептора VEGFR2 имела только тенденцию к снижению, причем более выраженную у больных с хорошим прогнозом.

Активность внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки также имела ряд особенностей (рис. 2). На фоне приема таргетных препаратов выявлено снижение активности протеасом в 3,33 раза у больных с хорошим прогнозом, при этом активность кальпаинов оставалась неизменной. Динамика изменений активности внутриклеточных протеиназ у больных с промежуточным прогнозом была противоположной: в ткани опухоли активность протеасом на фоне лечения не изменялась, а активность кальпаинов увеличилась в 8,6 раза. При этом известна значимость кальпаинов в активации локомоторных свойств опухолевых клеток [8]. Возможно, в связи с этим фактом можно обсуждать роль кальпаинов в механизмах прогрессирования заболевания у больных с промежуточным прогнозом и рассматривать этот показатель в качестве прогностического.

Таким образом, исходно высокие показатели экспрессии транскрипционного фактора HIF-1,

ростового фактора VEGF в опухоли почки ассоциированы с хорошим прогнозом заболевания по шкале MSKCC, что позволяет рассматривать эти параметры в качестве дополнительных информативных маркеров, сопряженных с исходом заболевания у больных диссеминированным раком почки. В случае, если на фоне приема таргетных препаратов эти молекулярные показатели подвергаются значительному снижению, это также ассоциировано с благоприятным исходом заболевания. Рост активности кальпаинов чаще наблюдается у больных раком почки с промежуточным прогнозом и сопряжен с более агрессивным течением заболевания. Полученные в ходе исследования данные позволяют полагать, что изучаемые молекулярные маркеры могут рассматриваться в качестве дополнительных прогностических критериев, которые позволяют повысить точность предсказания ожидаемого исхода заболевания и определить выбор оптимальной тактики лечения пациентов с диссеминированным ПКР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-3637.2015.7

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондакова И.В., Спирина Л.В., Коваль В.Д., Шашова Е.Е., Чойнзонов Е.Л., Иванова Э.В., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Слонимская Е.М., Усынин Е.А., Афанасьев С.Г. Химотрипсиноподобная активность и субединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека // Молекулярная биология. 2014. Т. 48., № 3. С. 444–451.
2. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А., Винтизенко С.И. Регуляция ангиогенеза при злокачественных новообразованиях почки и мочевого пузыря // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 4 (28). С. 65–70.
3. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А., Коломиец Л.А., Винтизенко С.И., Бочкарева Н.В., Чернышева А.Л. Активность протеасом и содержание ростовых факторов при раке почки, мочевого пузыря и эндометрия // Российский онкологический журнал. 2010. № 1. С. 23–25.
4. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Усынин Е.А., Юрмазов З.А. Регуляция экспрессии транскрипционных факторов и фактора роста эндотелия сосудов протеасомной системой при метастазировании рака почки // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2012. Т. 23, № 1. С. 27–32.
5. Atencio I.A., Ramachandra M., Shabram P., Demers G.W. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines // Cell Growth Differ. 2000. Vol. 11 (5). P. 247–253.
6. Ben-Shahar S., Komlos A., Nadav E., Shaked I., Ziv T., Admon A., DeMartino G.N., Reiss Y. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274 (31). P. 21963–21972.
7. Dirican A., Kucukzeybek Y., Somali I., Erten C., Demir L., Can A., Bahriye Payzin K., Vedat Bayoglu I., Akyol M., Koseoglu M., Alacacioglu A., Oktay Takhan M. The association of hematologic parameters on the prognosis of patients with metastatic renal cell carcinoma // J. BUON. 2013. Vol. 18 (2). P. 413–419.
8. Glading A., Bondar R.J., Reynolds I.J., Shiraha H., Satish L., Potter D.A., Blair H.C., Wells A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation // Mol. Cell Biol. 2004. Vol. 24 (6). P. 2499–2512.
9. Guertin D.A., Sabatini D.M. An expanding role for mTOR in cancer // Trends. Mol. Med. 2005. Vol. 11 (8). P. 353–361.
10. Heng D.Y., Xie W., Regan M.M., Warren M.A., Golshayan A.R., Sahi C., Eigl B.J., Ruether J.D., Cheng T., North S., Venner P., Knox J.J., Chi K.N., Kollmannsberger C., McDermott D.F., Oh W.K., Atkins M.B., Bukowski R.M., Rini B.I., Choueiri T.K. Prognostic factors for overall survival (OS) in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a

large multicenter study // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27 (34). P. 5794–5799. doi: 10.1200/JCO.2008.21.4809.

11. Heng D.Y., Xie W., Regan M.M., Harshman L.C., Bjarnason G.A., Vaishampayan U.N., Mackenzie M., Wood L., Donskov F., Tan M.-H., Rha S.Y., Agarwal N., Kollmannsberger C., Rini B.I., Choueiri T.K. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study // Lancet. Oncol. Vol. 14 (2). P. 141–148. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70559-4.

12. Hoffmann A., Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling // Immunol. Rev. 2006. Vol. 210. P. 171–186.

13. Juvekar A., Manna S., Ramaswami S., Chang T.P., Vu H.Y., Ghosh C.C., Celiker M.Y., Vancuriva I. Bortezomib induces nuclear translocation of Ikbα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL // Mol. Cancer Res. 2011. Vol. 9 (2). P. 183–194. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0368.

14. Keefe S.M., Nathanson K.L., Rathmell W.K. The molecular biology of renal cell carcinoma // Semin. Oncol. 2013. Vol. 40 (4). P. 421–428. doi: 10.1053/j.seminoncol.2013.05.006.

15. Metzger R.J., Bacik J., Schwartz L.H., Reuter V., Russo P., Marion S., Mazumdar M. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma // J. Clin. Oncol. 2004. Vol. 22 (3). P. 454–463.

16. Na X., Wu G., Ryan C.K., Shoen S.R., di Santagnese P.A., Messing E.M. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas // J. Urol. 2003. Vol. 170 (2 Pt 1). P. 588–592.

17. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium – influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // Br. J. Pharmacol. 2002. Vol. 135 (8). P. 1951–1958.

18. Spirina L.V., Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Koval V.D., Chernyshova A.L., Shipileva O.V. Association of growth factors, HIF-1 and NF-κB expression with proteasomes in endometrial cancer // Mol. Biol. Rep. 2012. Vol. 39 (9). P. 8655–8662. doi: 10.1007/s11033-012-1720-y.

19. Wu W.K., Volta V., Cho C.H., Wu Y.C., Li H.T., Yu L., Li Z.J., Sung J.J. Repression of protein translation and mTOR signaling by proteasome inhibitor in colon cancer cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. Vol. 386 (4). P. 598–601. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.080.

20. Yue C.X., Ma J., Zhou H.J. The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011. Vol. 42 (4). 445–450.

Поступила 18.03.15

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Юрмазов Захар Александрович, врач-онколог онкологического отделения № 3, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: (3822) 41-80-56. E-mail: pzahar@sibmail.com

Усынин Евгений Анатольевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения общей онкологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 41-80-92. E-mail: gusi70@list.ru. SPIN-код: 1804-0292

Спирина Людмила Викторовна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 51-45-98. E-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 1336-8363

Кондакова Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии опухолей, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 51-25-29. E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9338-4149

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения общей онкологии, Томский НИИ онкологии (г. Томск), Российская Федерация. Тел.: 8 (3822) 41-80-92. E-mail: slonimskaya@yandex.ru. SPIN-код: 7763-6417

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTORS, VEGF GROWTH FACTOR AND ITS RECEPTOR, m-TOR PROTEIN KINASE AND THE ACTIVITY OF INTRACELLULAR PROTEINASES IN PATIENTS WITH DISSEMINATED RENAL CELL CARCINOMA

Z.A. Yurmazov¹, E.A. Usynin¹, L.V. Spirina^{1,2}, I.V. Kondakova¹, E.M. Slonimskaya^{1,2}

Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk¹

Siberian State Medical University, Tomsk²

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia, e-mail: SpirinaLV@oncology.tomsk.ru¹

Abstract

Background. Search for more informative prognostic parameters in patients with renal cell carcinoma is an actual problem of modern oncology. **Purpose:** to study the prognostic significance of expression of transcription factors, VEGF growth factors, its receptors, m-TOR protein kinase and the activity of intracellular proteinases in patients with disseminated renal cell carcinoma. **Material and methods.** Forty patients with metastatic renal cell carcinoma ($T_{3-4}N_{0-1}M_1$) were included into the study. In accordance with the MSKCC scale, all patients were divided into 3 groups: with good prognosis ($n=13$), intermediate ($n=26$) and unfavorable prognosis ($n=1$). Further, the analysis included patients with good and intermediate prognosis ($n=39$). All patients received targeted therapy with pazopanib or everolimus. Palliative nephrectomy was performed after completion of preoperative treatment. The level of transcription and growth factors was studied using IFA method. The proteasome and calpain activities were assayed fluorometrically. **Results.** Initially high levels of the expression of HIF-1 transcription factor and VEGF growth factor in renal cell carcinoma were associated with good disease prognosis evaluated according to the MSKCC scale. The targeted therapy with pazopanib/everolimus resulted in decrease in the expression of HIF-1, NF- κ B p65, NF- κ B and p50 transcription factors, VEGF growth factor and the proteasome activity. The increased calpain activity in patients with intermediate prognosis was associated with disease progression. **Conclusion.** Additional molecular parameters that increase the informative value of the MSKCC scale were identified, allowing for more precise prediction of the disease outcome in patients with metastatic renal cell carcinoma.

Key words: disseminated renal cell carcinoma, NF- κ B, HIF-1, VEGF, proteasomes, calpains, prognosis.

REFERENCES

1. Kondakova I.V., Spirina L.V., Koval V.D., Shashova E.E., Chononov E.L., Ivanova E.V., Kolomiets L.A., Chernyshova A.L., Slonimskaya E.M., Usynin E.A., Afanas'ev S.G. Chymotrypsin-Like Activity and Subunit Composition of Proteasomes in Human Cancers // *Molecular Biology*. 2014. Vol. 48 (3). P. 444–451. [in Russian]
2. Spirina L.V., Kondakova I.V., Usynin Y.A., Vintzenko S.I. Angiogenesis regulation in renal and bladder cancers // *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2008. № 4 (28). P. 65–70. [in Russian]
3. Spirina L.V., Kondakova I.V., Usynin Y.A., Kolomiets L.A., Vintzenko S.I., Bochkareva N.V. Proteasome activity and growth factors expression in kidney, bladder and endometrial cancers // *Rossiyskiy onkologicheskij zhurnal*. № 1. P. 23–25. [in Russian]
4. Spirina L.V., Kondakova I.V., Usynin Y.A., Yurmazov Z.A. Expression of transcription factors and endothelial growth factor by proteasomal system in patients with metastatic renal carcinoma // *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*. 2012. Vol. 23, № 1. P. 27–32. [in Russian]
5. Atencio I.A., Ramachandra M., Shabram P., Demers G.W. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines // *Cell Growth Differ*. 2000. Vol. 11 (5). P. 247–253.
6. Ben-Shahar S., Komlosch A., Nadav E., Shaked I., Ziv T., Admon A., DeMartino G.N., Reiss Y. 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate // *J. Biol. Chem*. 1999. Vol. 274 (31). P. 21963–21972.

7. Dirican A., Kucukzeybek Y., Somali I., Erten C., Demir L., Can A., Bahriye Payzin K., Vedat Bayoglu I., Akyol M., Koseoglu M., Alacacioglu A., Oktay Takhan M. The association of hematologic parameters on the prognosis of patients with metastatic renal cell carcinoma // J. BUON. 2013. Vol. 18 (2). P. 413–419.
8. Glading A., Bondar R.J., Reynolds I.J., Shiraha H., Satish L., Potter D.A., Blair H.C., Wells A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation // Mol. Cell Biol. 2004. Vol. 24 (6). P. 2499–2512.
9. Guertin D.A., Sabatini D.M. An expanding role for mTOR in cancer // Trends. Mol. Med. 2005. Vol. 11 (8). P. 353–361.
10. Heng D.Y., Xie W., Regan M.M., Warren M.A., Golshayan A.R., Sahi C., Eigl B.J., Ruether J.D., Cheng T., North S., Venner P., Knox J.J., Chi K.N., Kollmannsberger C., McDermott D.F., Oh W.K., Atkins M.B., Bukowski R.M., Rini B.I., Choueiri T.K. Prognostic factors for overall survival (OS) in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a large multicenter study // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27 (34). P. 5794–5799. doi: 10.1200/JCO.2008.21.4809.
11. Heng D.Y., Xie W., Regan M.M., Harshman L.C., Bjarnason G.A., Vaishampayan U.N., Mackenzie M., Wood L., Donskov F., Tan M.-H., Rha S.Y., Agarwal N., Kollmannsberger C., Rini B.I., Choueiri T.K. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study // Lancet. Oncol. Vol. 14 (2). P. 141–148. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70559-4.
12. Hoffmann A., Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling // Immunol. Rev. 2006. Vol. 210. P. 171–186.
13. Juvekar A., Manna S., Ramaswami S., Chang T.P., Vu H.Y., Ghosh C.C., Celiker M.Y., Vancuriva I. Bortezomib induces nuclear translocation of Ikbα resulting in gene-specific suppression of NF-κB-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL // Mol. Cancer Res. 2011. Vol. 9 (2). P. 183–194. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0368.
14. Keefe S.M., Nathanson K.L., Rathmell W.K. The molecular biology of renal cell carcinoma // Semin. Oncol. 2013. Vol. 40 (4). P. 421–428. doi: 10.1053/j.seminoncol.2013.05.006.
15. Motzer R.J., Bacik J., Schwartz L.H., Reuter V., Russo P., Mariotti S., Mazumdar M. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma // J. Clin. Oncol. 2004. Vol. 22 (3). P. 454–463.
16. Na X., Wu G., Ryan C.K., Shoen S.R., di Santagnese P.A., Messing E.M. Overproduction of vascular endothelial growth factor related to von Hippel-Lindau tumor suppressor gene mutations and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in renal cell carcinomas // J. Urol. 2003. Vol. 170 (2 Pt 1). P. 588–592.
17. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium – influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // Br. J. Pharmacol. 2002. Vol. 135 (8). P. 1951–1958.
18. Spirina L.V., Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Koval V.D., Chernyshova A.L., Shpileva O.V. Association of growth factors, HIF-1 and NF-κB expression with proteasomes in endometrial cancer // Mol. Biol. Rep. 2012. Vol. 39 (9). P. 8655–8662. doi: 10.1007/s11033-012-1720-y.
19. Sun M., Shariat S.F., Cheng C., Ficarra V., Murai M., Oudard S., Pantuck A.J., Zigeuner R., Karakiewicz P.I. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review // Eur. Urol. 2011. Vol. 60 (4). P. 644–661. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.041.
20. Yue C.X., Ma J., Zhou H.J. The effect of RhoA and proteasome inhibitor MG132 on angiogenesis in tumors // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2011. Vol. 42 (4). P. 445–450.

ABOUT THE AUTHORS

Yurmazov Zakhar Alexandrovich, oncologist, General Oncology Department, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 41-80-56. E-mail: pzahar@sibmail.com

Usynin Evgeny Anatolyevich, MD, PhD, Researcher, General Oncology Department, Tomsk Cancer Research Center (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 41-80-92. E-mail: gusi70@list.ru. SPIN-code: 1804-0292

Spirina Lyudmila Viktorovna, MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Biochemistry, Tomsk Cancer Research Center (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 51-45-98. E-mail: spirinalv@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 1336-8363

Kondakova Irina Viktorovna, Tumor Biochemistry, Tomsk Cancer Research Center (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 51-25-29. E-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 9338-4149

Slonimskaya Elena Mikhailovna, MD, DSc, Professor, Head of General Oncology Department, Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk), Russian Federation. Phone: +7 (3822) 41-80-92. E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417