

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕВРОФИБРОМАТОЗА I ТИПА

Е.В. Степанова, М.Р. Личиницер, В.Ю. Бохян, А.А. Феденко, Т.К. Харатишвили, М.Д. Алиев
Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, г. Москва

Ключевые слова: молекулярно-биологические маркеры, нейрофиброматоз I типа, таргетная терапия

Нейрофиброматоз I типа — аутосомно-доминантное наследственное заболевание, связанное с мутациями в гене NF1. Основными молекулярными механизмами развития опухолей при нейрофиброматозе I типа является стимуляция ангиогенеза и сигнальных путей *ras*, АКТ-mTOR. Нами показано, что в этих опухолях экспрессируется *c-kit* и VEGF. Приводятся данные о клинических испытаниях таргетных препаратов у больных нейрофиброматозом I типа.

Нейрофиброматоз I типа (или болезнь Фон Реклингхаузена (von Recklinghausen neurofibromatosis)) является аутосомно-доминантным наследственным заболеванием, характеризующимся появлением многочисленных светло-коричневых очагов, узелков Лича и нейрофибром (доброкачественных шванном). Другими особенностями заболевания являются пигментные изменения кожи, аномальности скелета и проблемы с обучаемостью. Этой болезнью в мире болеет примерно один из 3000 человек [1, 2]. Средний возраст диагностирования заболевания составляет в среднем 3 года, 95% детей имеют к этому возрасту пигментные изменения кожи, у 60% обследованных детей выявляются узелки Лича.

Хотя нейрофибромы являются доброкачественными опухолями, у больных также могут возникать злокачественные шванномы (нейрофибросаркомы). Больные нейрофиброматозом I типа имеют большой риск развития некоторых злокачественных опухолей: феохромоцитом, детского миелоидного лейкоза, оптических и других глиом, рабдомиосарком и других опухолей [3, 4].

Заболевание связано с появлением мутаций в гене NF1, который картирован на 17q11.2 хромосоме. Он кодирует белок-супрессор опухолевого роста нейрофибромин [5]. Нейрофибромин участвует в контроле роста клеток и их дифференцировке по трем различным механизмам: снижая экспрессию вышележащих регуляторов *p21ras* как нижележащий эффектор *p21ras* и как связующий белок между тубулином и *p21ras* [6].

Основным методом лечения нейрофиброматоза является паллиативная хирургия и симптоматическое лечение. Тщательное наблюдение и раннее хирургическое вмешательство могут помочь минимизировать серьезные проблемы с нарушением функций органов, в которых возникла опухоль, обезображивание и другие осложнения, связанные с ростом опухоли. Исход лечения злокачественных шванном у таких больных остается плохим. 5-летняя выживаемость больных злокачественной шванномой на фоне нейрофиброматоза I типа составляет 16% по сравнению с 53% у больных без нейрофиброматоза [7, 4]. Метастазы, в основном в легкие, возникают у 39% таких больных. Прогноз больных зависит от размера опухоли и радикальности операции, но не от использования радио- и химиотерапии [7, 8]. Какого-либо дополнительного химиотерапевтического лечения таких больных для профилактики и лечения опухолей на сегодняшний день не существует. Однако достижения последних лет в области молекулярной биологии рака и внедрение в клиническую практику новых таргетных противоопухолевых препаратов позволяют надеяться на появление новых возможностей химиотерапевтического лечения больных нейрофиброматозом I типа.

Молекулярно-биологические маркеры при нейрофиброматозе I типа

Молекулярные изменения в клетках опухолей, возникших на фоне нейрофиброматоза I типа, плохо изучены. Показано, что нейрофибромин играет роль в активации молекулярных путей аденилатциклазы и АКТ-mTOR [9]. А также влияет на активацию белков Ras-GTPаз через фосфорилирование протеинкиназы C, что приводит к повышению подвижности клеток [9]. Кроме мутаций в гене-

Адрес для корреспонденции

Степанова Евгения Владиславовна
E-mail: e_stepanova@nm.ru

супрессоре опухолевого роста NF1, сообщается о мутациях в гене p53 [10].

Рецептор c-kit и его лиганд фактор роста стволовых клеток (SCF) также гиперэкспрессирован в нейрофибромах, тогда как экспрессия их в нормальных клетках Шванна не определяется [11]. Ингибирование активности c-Kit *in vitro* приводило к снижению пролиферации этих клеток. Высокий уровень SCF определяется в сыворотке больных нейрофиброматозом I типа [12].

Исследования *in vitro* показали, что тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF BB) является митогеном только для клеточных линий шванном, полученных от больных нейрофиброматозом I типа. Уровень экспрессии рецепторов тромбоцитарного фактора роста α и β (PDGFR α и PDGFR β) также повышен в NF1-положительных по сравнению с NF1-отрицательными клеточными линиями, полученными из опухолей [11].

Ангиогенез также участвует в формировании опухолей при нейрофиброматозе I типа. Мутации *ras* могут активировать синтез VEGF и bFGF [13]. Исследования злокачественных шванном, развившихся у больных нейрофиброматозом I типа, показали 6–15-кратное увеличение экспрессии VEGF по сравнению с нормальными клетками Шванна [14].

Предполагается, что определенную роль в образовании и прогрессировании злокачественных шванном может играть EGFR [15]. Так, экспрессию EGFR находят на опухолевых клетках, но не на нормальных клетках Шванна. Активация EGFR стимулирует пролиферацию клеток Шванна, содержащих мутантный ген нейрофибромина, и клеток злокачественных шванном в исследованиях *in vitro* [15, 16].

Изучение экспрессии мишеней таргетной терапии в ткани доброкачественных и злокачественных опухолей, развившихся на фоне нейрофиброматоза I типа (результаты собственных исследований)

Мы изучили экспрессию молекулярно-биологических маркеров (c-Kit, VEGF, bFGF) в ткани доброкачественных и злокачественных опухолей, развившихся на фоне нейрофиброматоза I типа (таблица). В анализ включен материал, получен-

ный от 4 больных с доказанной болезнью Реклингхаузена. У двух больных были удалены доброкачественные опухоли – нейрофибромы (одна с фокусами озлокачествления), у двух больных были удалены злокачественные опухоли (одна – нейрогенная саркома и плексиформная нейрофибросаркома).

Экспрессия c-Kit обнаружена только в образцах злокачественных опухолей, возникших на фоне нейрофиброматоза I типа, доброкачественные опухоли не экспрессировали этот белок. Интересно, что экспрессия c-Kit обнаруживается только у 27% больных злокачественными шванномами, не имеющих нейрофиброматоза.

Экспрессия ангиогенных факторов VEGF и bFGF обнаруживалась и при доброкачественных нейрофибромах, и при злокачественных опухолях. Однако интенсивность окрашивания антителами была незначительно выше в злокачественных опухолях.

Таким образом, в нашем исследовании показано, что в опухолях больных нейрофиброматозом I типа увеличивается экспрессия c-kit и VEGF, что позволяет рассматривать иматиниб и бевацизумаб как возможные эффективные препараты для лечения данной болезни при наличии экспрессии маркеров в ткани опухоли.

Перспективы использования таргетной терапии для лечения больных нейрофиброматозом I типа

Еще несколько лет назад не велись клинические испытания подходов к лечению больных нейрофиброматозом I типа. Достижения в разработке так называемых таргетных препаратов, блокирующих определенные белки-мишени опухолевых клеток, и создании мышиных моделей для оценки эффективности блокирования гена NF1 привели к тому, что несколько препаратов изучаются для лечения таких больных.

Ловастатин (Lovastatin) – гиполипидемическое средство, которое нарушает ранние этапы синтеза холестерина в печени и обычно используется при повышенном уровне холестерина. В настоящее время проводятся I и II фазы клинических испытаний (NCT00352599) по оценке влияния препарата на

Таблица. Экспрессия молекулярно-биологических маркеров при нейрофиброматозе I типа

№	Гистологический диагноз	c-Kit	VEGF	bFGF
1	Нейрофиброматоз с фокусами озлокачествления по типу злокачественной шванномы	Отсутствует	Экспрессируется 2+	Экспрессируется 1+
2	Нейрофиброма	Отсутствует	Экспрессируется 1+	Отсутствует
3	Нейрогенная саркома правой лопаточной области с наличием очагов миксоматоза, некроза и кровоизлияния	Экспрессируется 1+	Экспрессируется 3+	Экспрессируется 2+
4	Плексиформная нейрофибросаркома	Экспрессируется 2+	Экспрессируется 3+	Экспрессируется 2+

обучаемость больных детей. Ранее было показано, что мыши, имеющие мутации в гене NF1, имеют комплексные проблемы с обучаемостью, внимательностью и моторной координацией. Исследования таких мутантных мышей показали, что снижение способности к обучению связано с гиперактивностью белка *gas*, что приводит к дисбалансу между сигналами, активирующими клетки мозга и их ингибирующими, что приводит к дефициту контактов клетка-клетка, необходимых для обучения [17]. Было показано, что ловастатин может блокировать гиперактивность *gas*, репарировать контакты клетка-клетка и решать проблемы с обучаемостью взрослых мутантных по NF1 мышей [18].

Другой препарат-ингибитор *gas* и других белков — R115777 (Типифарниб, Tipifarnib). Показано, что он также ингибирует рост опухолевых клеток. В настоящее время идет II фаза клинических испытаний у детей и подростков с нейрофиброматозом I типа для блокирования роста прогрессирующих плексиформных нейрофибром (NCT00021541).

Продолжается I фаза клинических испытаний пирфенидона (Pirfenidone) для лечения подростков с нейрофиброматозом I типа и плексиформными нейрофибромами [19]. Препарат проходит III фазу клинических испытаний для лечения идиопатического фиброза легких. Также он ингибирует пролиферацию опухолевых клеток путем блокирования активности фактора роста фибробластов, эпидермального фактора роста, тромбоцитарного фактора роста и трансформирующего фактора роста β -1 [20]. При этом II фаза клинических испытаний взрослых показала, что препарат является перспективным для лечения нейрофиброматоза I типа [21].

В исследовании на мышинных моделях злокачественной шванномы на фоне нейрофиброматоза I типа изучалась активность антиангиогенного препарата SU5416 — малой молекулы, блокирующей рецепторы к VEGF. Показано снижение скорости роста опухоли по сравнению с нелеченными опухолями на 55% [14]. К сожалению, SU5416 показал высокую токсичность в I/II фазах клинических испытаний при различных злокачественных новообразованиях, поэтому был снят с дальнейшего исследования. Однако ингибиторы VEGF продолжают изучаться для лечения больных нейрофиброматозом I типа. Среди них Ранизумаб (Ranizumab) — фрагмент моноклонального антитела против VEGF. Два других ингибитора ангиогенеза: бевацизумаб (Bevacizumab) — моноклональное антитело против VEGF, и сунитиниб (Sunitinib) — малая молекула против ряда рецепторов, включая VEGFR-1 и VEGFR-2, являются перспективными препаратами для лечения нейрофиброматоза I типа.

Также идут испытания ингибитора mTOR си-ролимуса (Sirolimus), интерферона- α и других препаратов для лечения больных нейрофиброматозом I типа.

Многочисленные проводимые клинические и экспериментальные исследования позволяют надеяться, что в недалеком будущем в клиническую практику войдут новые эффективные препараты для лечения нейрофиброматоза I типа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Korf B.R. Clinical Features and Pathobiology of Neurofibromatosis 1. *J. Child Neurol.* 2002, v. 17, p. 573-577.
2. Ferner R.E. Neurofibromatosis type 1. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007, v. 15, № 2, p. 131-8.
3. Korf B.R. Plexiform neurofibromas. *Am. J. Med. Genet.* 1999, v. 89, p. 31-37.
4. Korf B.R. Malignancy in neurofibromatosis type I. *Oncologist.* 2000, № 5, p. 477-485.
5. Rasmussen S.A. and Friedman J.M. NF1 Gene and Neurofibromatosis 1. *Am. J. Epidemiol.* 2000, v. 151, p. 33-40.
6. Shen M.H., Harper P.S., Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J. Med. Genet.* 1996, v. 33, p. 2-17.
7. Ducatman B.S., Scheithauer B.W., Piepgras D.G. et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer.* 1986, v. 57, No. 10, p. 2006-2021.
8. Wanebo J.E., Malik J.M., VandenBerg S.R. et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 28 cases. *Cancer.* 1993, v. 71, No. 4, p. 1247-1253.
9. Lee M.J., Stephenson D.A. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.* 2007, v. 20, No. 2, p. 135-41.
10. Vogel K.S., Klesse L.J., Velasco-Miguel S. et al. Mouse tumor model for neurofibromatosis type I. *Science.* 1999, v. 286, p. 2176-2179.
11. Badache A., De Vries G.H. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. *J. Cell. Physiol.* 1998, v. 177, No. 2, p. 334-342.
12. Mashour G.A., Driever P.H., Hartmann M. et al. Circulating Growth Factor Levels Are Associated with Tumorigenesis in Neurofibromatosis Type 1. *Clin. Cancer Res.* 2004, No. 10, p. 5677-5683.
13. Kranenburg O., Gebbink M.F., Voest E.E. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, v. 1654, № 1, p. 23-37.
14. Angelov L., Salhia B., Roncari L. et al. Inhibition of Angiogenesis by Blocking Activation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Leads to Decreased Growth of Neurogenic Sarcomas. *Cancer Res.* 1999, v. 59, p. 5536-5541.
15. DeClue J.E., Heffelfinger S., Benvenuto G. et al. Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. *J. Clin. Invest.* 2000, v. 105, No. 9, p. 1233-1241.
16. Li H., Velasco-Miguel S., Vass W.C. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways Are Associated with

- Tumorigenesis in the Nf1;p53 Mouse Tumor Model. *Cancer Res.* 2002, v. 62, p. 4507-4513.
17. Costa R.M., Federov N.B., Kogan J.H. et al. Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature.* 2002, v. 415, p. 526-530.
18. Li W., Cui Y., Kushner S.A., Brown R.A. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr. Biol.* 2005, v. 15, p. 1961-1967.
19. Babovic-Vuksanovic D., Widemann B.C., Dombi E. et al. Phase I trial of pirfenidone in children with neurofibromatosis 1 and plexiform neurofibromas. *Pediatr. Neurol.* 2007, v. 36, № 5, p. 293-300.
20. Krishnan S., Globle J.M., Frederick L.A. et al. Inhibitory effect of perfendinone on glioblastoma cell lines: implications for treatment of neurofibromatosis. *J. Applied Res.* 2007, v. 1, No. 7, p. 58-68.
21. Babovic-Vuksanovic D., Ballman K., Michels V. et al. Phase II trial of pirfenidone in adults with neurofibromatosis type 1. *Neurology.* 2006, v. 67, No. 10, p. 1860-1862.
- Статья поступила 22.11.2010 г., принята к печати 21.12.2010 г.
Рекомендована к публикации Г.Н. Мачаком

MOLECULAR BIOMARKERS OF TYPE I NEUROFIBROMATOSIS

Stepanova E.V., Lichinitser M.R., Bokhyan B.Y., Fedenko A.A., Charatishvili T.K., Aliev M.D.
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow,
Russian Federation

Key words: molecular biomarkers, neurofibromatosis I type, target therapy

Neurofibromatosis type I is a autosomal dominant hereditary disorder caused by NF1 gene mutations. The main molecular mechanisms contributes to tumor formation in neurofibromatosis type I is angiogenesis stimulation and ras, AKT-mTOR signaling pathways activation. We show that these tumors expressed c-kit and VEGF. Information about clinical trials of target therapy for neurofibromatosis I type patient treatment is cited.