

ЛАЗАРЕВИЧ Н. Л., КРИВЦОВА О. М., СКОВОРОДНИКОВА П. А.
LAZAREVICH N. L., KRIVTSOVA O. M., SKOVORODNIKOVA P. A.

Молекулярно-генетические особенности клинического прогноза ГЦР

Цитирование: Лазаревич Н.Л., Кривцова О.М., Сквородникова П.А. Молекулярно-генетические особенности клинического прогноза ГЦР // Злокачественные опухоли. — 2016. — № 4, спецвыпуск 1. С. — 40–45.

DOI: 10.18027/2224–5057–2016–4s1–40–45

Резюме

Гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) — одна из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований, характеризующаяся поздними сроками выявления, устойчивостью к химиотерапии и крайне неблагоприятным прогнозом. Молекулярно-биологические исследования последних лет показали, что по спектру вызывающих его молекулярных событий этот тип опухолей является крайне гетерогенным.

В настоящем обзоре рассмотрены основные молекулярно-генетические нарушения, характерные для ГЦР, роль хронической инфекции вирусами гепатита В и С в развитии опухолей, проблема опухолевой гетерогенности и другие сложности и ограничения, препятствующие разработке действенных подходов к прогнозированию течения болезни и выбору оптимальной тактики лечения. Рассмотренные данные указывают на то, что разделение случаев ГЦР на отдельные субклассы в зависимости от их этиологических, морфологических или генетических особенностей может позволить идентифицировать достоверные факторы прогноза внутри отдельных групп и оптимизировать подходы к выбору мишеней для направленной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

гепатоцеллюлярный рак, мутации, транскриптом, опухолевая гетерогенность, факторы прогноза

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Лазаревич Наталия Леонидовна — НИИ Канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва, e-mail: lazarevich.nl@gmail.com

Кривцова Ольга Михайловна — НИИ Канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва

Сквородникова Полина Андреевна — НИИ Канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва

Гепатоцеллюлярный рак (ГЦР) является одной из наиболее распространенных форм рака в мире и самой частой злокачественной опухолью печени. Среди злокачественных новообразований ГЦР занимает шестое место по распространенности и второе по смертности. Ежегодно фиксируется 600–800 тысяч новых случаев и примерно столько же смертельных исходов [1]. Высокая смертность и низкая эффективность лечения ГЦР определяются поздними сроками выявления заболевания и устойчивостью к химиотерапии [2]. Наиболее значимыми факторами риска для возникновения ГЦР являются хронические инфекции вирусами гепатита В (HBV) и С (HCV), алкогольная болезнь печени, отравление химическими гепатоканцерогенами, неалкогольный стеатогепатит и некоторые генетически наследуемые заболевания (порфирия, дефицит α 1-антитрипсина, гемохроматоз, тирозинемия и др.) [3]. Для пациентов с ранними стадиями ГЦР в качестве лечения применяется хирургическая резекция, радиочастотная абляция или трансплантация, на поздних стадиях проводится трансартериальная хемоземболизация или лечение таргетным препаратом сорафениб, эффективное лишь для небольшой части больных [3]. Исследования других таргетных препаратов, предлагаемых

для лечения ГЦР, пока не дали удовлетворительных результатов. До настоящего времени не предложено достаточно надежных прогностических маркеров для оценки уровня злокачественности ГЦР, которые бы способствовали выбору оптимальных схем терапии этого заболевания.

В настоящем обзоре мы рассмотрим основные молекулярно-генетические нарушения, характерные для ГЦР, сложности и ограничения, препятствующие разработке эффективных подходов к прогнозированию течения болезни и выбору оптимальной тактики лечения, и перспективы развития исследований в этой области.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ГЦР

Каждый клинический случай ГЦР характеризуется уникальным набором драйверных (функционально-значимых, способствующих развитию злокачественного фенотипа) мутаций, выявление которых может позволить понять механизм опухолевой трансформации, идентифицировать дополнительные факторы риска и предложить подходы для направленной терапии.

Классические молекулярно-биологические методы и активно развивающиеся в последние годы технологии массового параллельного секвенирования генома или его кодирующей части (экзома) опухолей позволили установить, что в среднем экзом ГЦР содержит от 40 до 80 соматических мутаций, основными драйверами гепатоканцерогенеза являются мутации генов TERT, CTNNB1, TP53, ARID1A/2, AXIN1 и ряда других.

Активация теломеразы является одним из ключевых событий при злокачественной трансформации гепатоцитов. Мутации в промоторном районе, инсерция вирусной ДНК или амплификации гена регуляторной субъединицы теломеразы TERT являются наиболее часто выявляемым генетическим нарушением не только в ГЦР (~70%), но и в пренеопластических узелках, то есть являются, по-видимому, ранним событием трансформации гепатоцитов, обеспечивающим их репликативное бессмертие. Кроме того, соматические мутации в ГЦР чаще всего затрагивают гены опухолевого супрессора p53 (TP53) и многофункционального белка β-катенина (CTNNB1), вовлеченного как в процессы межклеточной адгезии, так и в регуляцию Wnt-зависимого сигнального каскада (~30% случаев для каждого гена); регулятора стабильности β-катенина AXIN1 (11%); ARID1A, который определяет степень компактизации хроматина, регулируя таким образом процессы транскрипции генов, репликации и репарации ДНК (13%); CDKN2A, кодирующего ингибиторы циклинзависимых киназ p16INK4a и p14ARF (9%) [4]. Профиль генетических изменений и спектр затрагиваемых ими сигнальных путей может зависеть как от стадии опухолевого процесса, так и от этиологических факторов, влияющих на возникновение ГЦР, так, например, мутации в гене CTNNB1 преобладают в опухолях, не ассоциированных с инфекцией HBV. Мутации генов CTNNB1 и TP53, CTNNB1 и AXIN1 в подавляющем большинстве опухолей являются взаимоисключающими.

С меньшей частотой в ГЦР выявляются мутации генов семейства KMT2/MLL, кодирующих гистоновые метилтрансферазы (11%); сенсора повреждения ДНК ATM (6%); опухолевого супрессора RB1 (4%); регуляторов окислительного стресса NFE2L2 (6%) и KEAP1 (4%), компонентов сигнальных путей PI3K/mTOR, MAPK, JAK/STAT, TGFβ и др. [4].

Все эти данные свидетельствуют о том, что по спектру генетических нарушений ГЦР представляет собой крайне гетерогенный класс опухолей. Такая гетерогенность драйверных нарушений, профиль которых может служить основанием для выбора мишеней для направленной терапии ГЦР у конкретного пациента, а также тот факт, что эффективные таргетные препараты для лечения опухолей с наиболее часто представленными мутациями (TERT, CTNNB1, TP53, ARID1A/2, AXIN1) пока не предложены, значительно осложняет разработку эффективных стратегий для лечения ГЦР.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Помимо исследования структурных нарушений генома опухолей, к настоящему времени проведено огромное количество исследований, посвященных поиску и анализу нарушений в транскрипционной программе клетки, которые бы позволили выявить новые диагностические маркеры ГЦР, наиболее универсальные нарушения экспрессии онкогенов и опухолевых супрессоров или активности внутриклеточных сигнальных путей, которые влияют на приобретение клетками злокачественных свойств и могут рассматриваться как ключевые события, определяющие опухолевый рост и метастазирование, а также факторы прогноза.

Эти исследования показали, что гены, экспрессия которых наиболее значимо повышается при прогрессии ГЦР, кодируют транскрипционные факторы, белки, участвующие в передаче сигнала, метаболические ферменты, транспортные и адгезионные молекулы. Важнейшими событиями, определяющими злокачественную трансформацию гепатоцитов и прогрессию ГЦР, являются изменения спектров экспрессии генов, приводящие к изменению активности сигнальных путей, регулируемых васкулоэндотелиальным фактором роста (VEGF), фактором роста тромбоцитов (PDGF), эпидермальным фактором роста (EGF), трансформирующим фактором роста β (TGFβ), инсулиноподобным фактором роста (IGF), фактором роста гепатоцитов (HGF), каскадами митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)/AKT/mTOR, сигнальными каскадами Wnt/β-катенин и Hippo [2, 5].

Анализ изменения транскрипционных профилей генов при гепатоканцерогенезе, выявляемых методами гибридизации с микрочипами или полнотранскриптомного секвенирования позволил предложить несколько десятков систем классификации молекулярных профилей подклассов ГЦР, которые направлены на выбор оптимальной терапевтической стратегии и предсказание отдаленных результатов лечения пациентов.

Первая предложенная система классификации образцов ГЦР по профилю транскриптомных изменений в опухолевой ткани, предложенная группой S. Thorgeisson в 2004 г., разделяла образцы на две группы, А и В. Группа А («пролиферативная») характеризуется гиперэкспрессией генов, отвечающих за пролиферацию, прохождение клеточного цикла и метаболизм ДНК и ассоциирована с хромосомной нестабильностью и неблагоприятным прогнозом [6].

Группа J. Llovet предложила подразделять ГЦР на 3 субкласса (S1, S2, S3), ассоциированных с размером опухоли, степенью ее дифференцировки и уровнем экспрессии онкоэмбрионального маркера альфа-фетопротеина (АФП). Для группы S1 характерна активация WNT сигнального пути (за счет активирующих мутаций CTNNB1 и активации TGFβ сигнального пути), для S2 — активация MYC, AKT и активная пролиферация, S3 ассоциирована с дифференцировкой гепатоцитов [7]. Молекулярная классификация, предложенная группой J. Zucman-Rossi, разделяет ГЦР на два основных кластера, включающих 6 подгрупп (G1–G6). Кластер G4-G6 характеризуется хромосомной стабильностью, причем группы G5 и G6 ассоциированы с G5-G6 наличием активирующих мутаций в гене CTNNB1. В кластере G1-G3 наблюдается хромосомная нестабильность, как и в «пролиферативной» группе А, при этом подгруппы G1-G2 ассоциированы с хронической инфекцией HBV, G1 характеризуется экспрессией маркеров стволовых клеток и эмбриональных генов (в том числе АФП), а подгруппа G3 включает опухоли с неблагоприятным прогнозом, в которых инактивированы гены TP53 и CDKN2A и нарушена экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточного цикла [8]. При сравнении нескольких предложенных систем молекулярной классификации на общей выборке из 287 случаев ГЦР молекулярный профиль G3 оказался наиболее точным способом предсказания раннего рецидивирования [9].

Развитием этого направления стала предложенная той же исследовательской группой на основе анализа данных по безрецидивной выживаемости пациентов после резекции ГЦР сигнатура из 5 генов (HN1, RAN, RAMP3, KRT19 и TAF9) [10]. Предсказательный эффект предложенной сигнатуры протестирован на нескольких независимых выборках образцов ГЦР, в том числе на парафиновых срезах, что существенно расширяет возможности для использования предлагаемого подхода в клинической практике.

Кроме описанных, в настоящее время предложены системы транскриптомного профилирования на основании экспрессии генов в неопухоловой ткани печени, затронутой циррозом [11] или спектра экспрессии регуляторных микро-РНК, на основании которой описана ассоциация падения уровня экспрессии miR-26 со снижением общей выживаемости пациентов с ГЦР, ассоциированным с хронической инфекцией HBV или HCV, и чувствительностью к терапии интерфероном- α [12]. Необходимо отметить, что значительная часть проведенных исследований проведена на выборках клинических образцов, полученных при резекции опухолей, т. е. состоящих преимущественно из ГЦР на ранней или промежуточной стадии развития опухолевого процесса, и требует дальнейшей верификации на расширенных коллекциях клинического материала.

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ ГЕНОМНЫХ И ТРАНСКРИПТОМНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Около 80% случаев ГЦР ассоциированы с инфекцией HBV или HCV. При хроническом носительстве HBV риск возникновения ГЦР возрастает в 5–15 раз, для HCV — в 11.5–17 раз по сравнению с пациентами, не страдающими хроническим вирусным гепатитом [13]. HBV и HCV могут оказывать прямое или косвенное действие на развитие ГЦР. Некоторые вирусные белки (HBx HBV, белки NS5A, NS3 и коровый белок HCV) непосредственно влияют на уровни экспрессии ряда генов клетки-хозяина. Хроническая инфекция HBV и HCV вызывает ряд последовательных событий, приводящих к циррозу: некроз клеток печени, воспаление, регенерация, истощение ресурсов гепатоцитов и фиброз [5, 14]. При воспалении активируется синтез активных форм кислорода (АФК), создавая среду, способствующую мутагенезу, опухолевой прогрессии и выживанию клеток, имеющих злокачественный фенотип [15]. HCV и HBV, провоцируя хроническое воспаление и окислительный стресс, индуцируют изменение активности некоторых общих сигнальных путей, связанных с p53, Rb, Wnt/ β -катенином, Raf/MAPK, TGF β и Ca $^{2+}$ -опосредованной сигнализацией [5]. Хронический гепатит характеризуется повторяющимися циклами некроза и регенерации, в результате чего могут происходить и накапливаться генетические изменения, например, нарушение системы репарации ДНК [14]. Косвенное влияние оказывает иммуноопосредованное воспаление, вызываемое обоими вирусами гепатита [15]. HBV содержит частично двуцепочечную кольцевую ДНК, которая может встраиваться в геном клетки-хозяина. Интеграция вирусной ДНК происходит при воспалении в процессе пролиферации гепатоцитов, в опухолях чаще всего наблюдается встраивание участков, кодирующих белок HBx. Хотя специфических сайтов встраивания вирусной ДНК в геном не выявлено, с наибольшей частотой интеграция наблюдается в хромосомы 11 и 17. Интеграция HBV в конкретный участок генома может вызывать инактивацию генов, кодирующих опухолевые супрессоры; хромосомную нестабильность; формирование слитных генов с новыми свойствами; активацию генов, ассоциированных с канцерогенезом, промоторными или энхансерными последовательностями вируса. Наиболее высокая частота интеграции HBV в геном ГЦР описаны в районе генов TERT, определяющего репликативное бессмертие клеток (10–15%), гистоновой метилтрансферазы KMT2B/MLL2, регулирующей конформацию хроматина и экспрессию генов (5–10%), и циклина E, контролирующего переход из G1 в S фазу клеточного цикла (5%) [4].

HBx представляет собой транс-активационный белок, который активирует большое количество клеточных и вирусных генов, включая гены контроля пролиферации и апоптоза, снижает уровень протеасомной деградации β -катенина [13, 14]. Среди мишеней HBx — циклины и циклин зависимые киназы (CDK), компоненты сигнальных путей Ras/Raf/MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа), Smad, Wnt, PI3K, JAK/STAT, NF- κ B и Hedgehog, ответственные за рост и выживание клеток [13; 15]. Ядерный HBx регулирует транскрипцию путем активации факторов CREB, ATF-2, ATF-3, NFAT, C/EBP β , блокирует каспазы 3 и 8, подавляя апоптоз, усиливает проопухоловое действие TGF β в клетке, превращая его из негативного регулятора роста в опухолевый промотор [15]. HBx подавляет активность p53 путем прямого связывания или подавления транскрипции, способствует фосфорилированию (инактивации) Rb, подавляет некоторые ингибиторы CDK, ингибирует белок эксцизионной репарации нуклеотидов DDB1, что способствует появлению многоядерных клеток или микроядер в клетках. Воздействуя на митохондрии, HBx увеличивает уровень АФК, что в сочетании с интенсивной пролиферацией повышает риск появления и накопления мутаций. При гипоксии HBx способствует выживанию и росту клеток, активируя фактор, индуцируемый гипоксией HIF1 α , который инициирует транскрипцию ангиопоэтина-2 и VEGF и активирует металлопротеиназы, разрушающие внеклеточный матрикс. Таким образом, HBx играет важную роль в дестабилизации генома, влияет на клеточный ответ на гипоксию и стимулирует ангиогенез [15]. Кроме того, HBx индуцирует эпигенетическое подавление экспрессии многих генов и является ключевым фактором инициации эпигенетических изменений в результате взаимодействия с ДНК-метилтрансферазой 3a, осуществляющей метилирование ДНК.

Поскольку HCV — одноцепочечный РНК-позитивный вирус, не обладающий обратной-транскриптазной активностью, вирусная РНК не встраивается в геном клетки-хозяина. Поэтому HCV-ассоциированные случаи ГЦР обычно возникают на фоне цирротических изменений печени, связанных с хроническим воспалением и окислительным стрессом. Кроме того, на различных модельных системах продемонстрирована способность вирусных белков NS3, N4B, NS5B и корового белка HCV стимулировать злокачественную трансформацию за счет индукции пролиферации, подавления апоптоза, влияния на активность внутриклеточных сигнальных каскадов и модуляции иммунного ответа [13, 15].

Таким образом, хроническая инфекция HCV и HBV непосредственно влияет на процессы пролиферации, дифференцировки и выживания клеток печени, способствуя трансформации гепатоцитов. В то же время различные механизмы действия HBV и HCV, наличие или отсутствие цирроза в печени определяют различные сценарии злокачественной трансформации, реализующиеся в каждом конкретном случае.

Важно отметить, что поскольку влиянию хронического воспаления, цирротических изменений или хромосомных нарушений, связанных с интеграцией HBV в геном гепатоцитов, подвергаются перманентно все клетки печени, хроническая вирусная инфекция может приводить к параллельному появлению множественных очагов пролиферации, возникающих вследствие независимых генетических событий, то есть к формированию поликлональных опухолей, находящихся на разных стадиях опухолевой прогрессии (мультицентрический канцерогенез) [16]. Спектр молекулярно-генетических изменений, способствовавших формированию каждого опухолевого узла, может влиять как на прогноз развития заболевания, так и на выбор оптимальной тактики лечения.

МУЛЬТИФОКАЛЬНЫЕ ГЦР

Наиболее эффективным методом лечения больных ГЦР при отсутствии противопоказаний является резекция печени, однако частота рецидивов заболевания в течение пяти лет после операции составляет, по разным оценкам, от 70 до 100% случаев и снижает общую выживаемость. Кроме того, нередко при диагностике ГЦР выявляют несколько опухолевых узлов [17, 18, 19]. Мультифокальный ГЦР и рецидивы заболевания могут возникать в результате образования независимых опухолей *de novo*, развития опухолей из сателлитных узелков, оставшихся после резекции первичной опухоли и не выявленных методами компьютерной томографии и МРТ, а также в результате метастазирования первичной опухоли [20]. У одного пациента могут обнаруживаться узлы нескольких типов [20, 21]. При этом клинико-патологические характеристики мультифокальных и рецидивирующих ГЦР различаются в зависимости от происхождения последних.

Мультицентрический рост ГЦР является достаточно распространенным явлением, поскольку гепатоканцерогенез протекает на фоне имеющихся у пациента хронических заболеваний печени. Независимые фокусы роста ГЦР чаще образуются на фоне хронического цирроза печени, при этом риск возникновения множественных узлов выше при HCV-ассоциированном ГЦР, чем при HBV-ассоциированном ГЦР, что связывают с активным хроническим воспалением на фоне HCV [17, 21, 22]. Образование внутривисцеральных метастазов ГЦР коррелирует с более поздними по сравнению с развитием множественных независимых ГЦР стадиями (II и III против I и II стадий по системе Эдмонсона). Кроме того, для группы пациентов с образовавшимися *de novo* опухолями по сравнению с группой пациентов с внутривисцеральными метастазами ГЦР характерна более длительная безрецидивная (23,9–33,8 против 14,2–15,6 месяцев) и общая выживаемость (130,8±8,5 против 80,5±8,5 месяцев) [21, 23].

Рекомендации по лечению пациентов с ГЦР, имеющими внутривисцеральные метастазы, и независимыми мультифокальными опухолями и его эффективности также различаются. При наличии у пациента внутривисцеральных метастазов ГЦР рекомендовано применение интервенционной и адъювантной терапии [21, 24]. При повторной резекции образовавшейся *de novo* опухоли однолетняя и трехлетняя выживаемость пациентов составили 100% и 80%, а в группе пациентов с внутривисцеральными метастазами ГЦР — 91,7% и 38,1% соответственно [25].

Таким образом, поскольку от происхождения мультифокальных и рецидивирующих ГЦР зависят прогноз выживаемости и тактика лечения пациента, важной задачей является определение клональности и межопухолевой гетерогенности таких ГЦР.

Для дифференциальной диагностики возникающих *de novo* и метастатических ГЦР предлагается ряд методов. Оценка морфологических [17] и клинико-патологических характеристик, в частности, развития опухоли на фоне цирроза, хронического гепатита В и/или С, размера и расположения опухолевых узлов, наличия эмболии портальной вены и/или сосудов микроциркуляторного русла, стадии ГЦР и сроков безрецидивной выживаемости после резекции первичной опухоли не всегда позволяют однозначно разграничить две группы. Кроме того, по ряду параметров (размер опухоли при рецидиве, уровень сывороточного АФП) достоверных различий между группами не наблюдается, а по некоторым (локализация опухоли, количество узлов) имеющиеся в литературе данные противоречат друг другу [21, 23]. Для анализа клональности могут быть использованы цитогенетические методы, например, метод сравнительной геномной гибридизации метафазных хромосом с дифференциально мечеными образцами ДНК, выделенной из опухолевой ткани, применяемый для выявления хромосомных aberrаций [26] или метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Кроме того,

для определения клональности могут быть использованы различные молекулярно-биологические подходы — метод определения клональности опухолей человека разработанный в том же году А. Jeffrey's метод полиморфизма длин рестриционных фрагментов, заключающийся в анализе «ДНК-отпечатков», полученных в результате разрезания последовательности ДНК рестриционными эндонуклеазами в высокополиморфных сайтах генов, расположенных на X-хромосоме, и сайтов, по которым происходит метилирование при инактивации X-хромосомы у женщин [27]; метод фингерпринтинга ДНК, который позволяет детектировать наличие соматических изменений, например, делеций и амплификаций [28], а также определение профилей интеграции HBV в ДНК пациента с помощью полимеразной цепной реакции и Саузерн-блоттинга и анализ утраты гетерозиготности по микросателлитным локусам.

В целом, классические цитогенетические и молекулярно-биологические методы достаточно надежны и доступны, позволяют установить клональность опухолевых узлов и выявить некоторые потенциально драйверные события, однако имеют ограничения (например, позволяют проводить диагностику только у HBV-положительных пациентов) и являются менее информативными, чем методы, основанные на полногеномном и полноэкзомном секвенировании опухолей, которые позволяют одновременно оценить паттерн интеграции вирусной ДНК у HBV-положительных пациентов, а также выявить соматические мутации и хромосомные aberrации.

На основе данных полногеномного и полноэкзомного секвенирования 43 образцов HBV-ассоциированной ГЦР 10 пациентов и соответствующей им нормальной ткани Хие и соавторы выявили высокий уровень межопухолевой гетерогенности мультифокальных ГЦР. У разных пациентов доля общих соматических мутаций в опухолевых узлах составила от 8 до 97%. Напротив, в двух независимо возникших опухолях одного пациента общих соматических мутаций выявлено не было, набор потенциально драйверных мутаций и сайты интеграции HBV в них различались. Доля общих для узлов ГЦР одного пациента амплификаций и делеций варьировала от 22,2 до 100% [20].

Построенные на основе этих данных филогенетические деревья показывают, что метастазирование может происходить как на ранних (порядка 20% общих с первичной опухолью соматических мутаций в метастазе), так и на более поздних этапах прогрессии. В двух исследованных Хие и соавторами опухолевых тромбах доля общих с первичной опухолью мутаций составляла около 40%, а в девяти сателлитных узлах, обнаруженных у семи пациентов — около 90%. Таким образом, образование сателлитных узлов происходит на более поздних этапах прогрессии опухолей. Кроме того, авторы показали, что большинство потенциально драйверных соматических мутаций и интеграций HBV в драйверные гены являются ранними и, следовательно, общими для первичных ГЦР и их метастазов событиями, однако, у некоторых пациентов обнаруживаются потенциально драйверные мутации и интеграции HBV, специфические для отдельных метастазов, например, мутации в CTNNB1, RUNX1T1 и интеграции в TERT и MLL4/KMT2B [20]. Miao и соавторы для определения клональности мультифокальных HBV-ассоциированных ГЦР провели полногеномное секвенирование образцов тканей двух пациентов. В результате анализа сайтов интеграции HBV, соматических мутаций, небольших инсерций, делеций и хромосомных aberrаций было установлено, что множественные узлы ГЦР одного из пациентов с низкодифференцированной первичной опухолью происходят от ее субклонов, тогда как две опухоли другого пациента возникли независимо. Кроме того, сопоставление частоты и функциональных эффектов мутаций в кодирующих участках генов показало, что при прогрессии опухоли отношение числа мута-

ций, приводящих к изменению структуры белка к количеству синонимичных замен возрастает. Так, в метастазах пациента 1 оно составляет 1.49, в опухолевом тромбе портальной вены — 1.17, в первичной опухоли — 0.96, а для двух независимых ГЦР пациента 2 эти значения практически не различаются и составляют порядка 0.8. Приведенные данные свидетельствуют о росте уровня межузловой гетерогенности при метастазировании ГЦР, а также о наличии положительного отбора мутаций, дающих селективное преимущество опухолевым субклонам [18].

Таким образом, в идеале для надежной дифференциальной диагностики возникших *de novo* и метастатических ГЦР оптимальным способом является проведение полногеномного и/или полноэкзомного секвенирования. Принимая во внимание высокий уровень межопухоловой гетерогенности ГЦР, при анализе генетических нарушений по возможности не следует ограничиваться исследованием первичной опухоли/одного узла, поскольку потенциальные драйверные события различаются в случае независимо возникших опухолей, а в опухолях, возникших из клона первичного узла, также могут варьировать, особенно при ее раннем метастазировании.

Транскриптомный анализ также позволяет выявлять потенциальные маркеры ГЦР и мишени для терапии. Анализ транскриптомов пациентов с HBV-ассоциированного ГЦР из расширенной выборки из 174 пациентов позволил Miao и соавторам выявить 4 потенциальных маркера дифференцировки ГЦР, а именно SFN, кодирующего адаптерный белок, задействованный в активации каскада Akt/mTOR, TTK, кодирующего протеинкиназу сигнального пути p53, гена, кодирующего серин-треониновую киназу митотического чекпойнта BUB1 и MCM4, кодирующего субъединицу ДНК-хеликазного комплекса. Согласно данным, представленным авторами, уровень экспрессии TTK может рассматриваться как независимый прогностический критерий метастатического потенциала ГЦР, сроков безрецидивной и общей выживаемости. Медиана продолжительности безрецидивной выживаемости среди пациентов, в ГЦР которых TTK экспрессируется на высоком уровне, составляет 3.53 месяца по сравнению с 12.48 месяцами в группе пациентов с низкой экспрессией TTK в опухоли [18]. Сопоставление данных экзомного секвенирования образцов независимых мультифокальных ГЦР и их метастазов одного пациента привело к обнаружению Shi и соавторами потенциального драйвера гепатоканцерогенеза. Несмотря на независимое происхождение двух первичных ГЦР в FAT4 были обнаружены мутации, приводящие к аминокислотным заменам во вне- и внутриклеточном доменах. Проведенное на расширенной панели из 60 пар образцов нормальной и опухолевой ткани пациентов с HBV-ассоциированным ГЦР, а также 25 линий клеток гепатомы секвенирование по Сэнгеру привело к выявлению в 16 образцах ГЦР 15 миссенс-мутаций и 1 нонсенс-мутации FAT4, а также обнаружению мутаций указанного гена в 14 клеточных линиях. Наличие мутаций в FAT4 на выборке из 60 случаев ГЦР коррелировало с инвазией в сосуды ($P = 0.032$), поздними стадиями опухолевой прогрессии ($P = 0.088$) и высоким риском рецидива заболевания ($P = 0.041$) [29].

ФИБРОЛАМЕЛЛЯРНАЯ КАРЦИНОМА — ОТДЕЛЬНЫЙ ПОДТИП ГЦР С УНИКАЛЬНЫМ СПЕКТРОМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

Ярким примером того, что разделение случаев ГЦР на отдельные субклассы в зависимости от их этиологических, морфологических или генетических особенностей может привести к идентификации новых критических детерминант опухолевого роста или мишеней для направленной терапии является серия работ, посвященных исследованию молекулярно-генетиче-

ских нарушений в отдельном гистологическом подтипе ГЦР — фиброламееллярных ГЦР (флГЦР). флГЦР выявляются обычно у молодых пациентов (до 30 лет), не связан с хроническими патологиями печени, такими как цирроз или вирусные гепатиты. флГЦР характеризуется крупными плеiomорфными гепатоцитами с большими ядрами, наличием в строме ламеллярных коллагеновых волокон, образующих разветвленную сеть и часто имеет агрессивное течение с неблагоприятным прогнозом [30]. В 2014 году при полнотранскриптомном секвенировании образцов флГЦР был впервые описан химерный ген, который выявляется только в опухолевых клетках, и не встречается в клетках печени тех же пациентов [31]. Такой ген образуется в результате делеции участка 19 хромосомы длиной около 400 тысяч пар нуклеотидов, приводящей к слиянию генов DNAJB1 (шаперон DnaJ) и PRKACA (каталитическая субъединица протеинкиназы A). Образующийся химерный белок сохраняет киназный домен протеин киназы A, активирующий Ras и MAPK сигнальные пути, эстрогеновую сигнализацию и апоптоз, однако теряет домен, регулирующий его активность. Экзогенная экспрессия химерного варианта DNAJB1-PRKACA в культурах клеток гепатом человека вызывает повышение скорости пролиферации и колониеобразующего потенциала [32]. Экспрессия химерного гена в 80–100% опухолей и его отсутствие в нормальных клетках позволяет предполагать ключевую роль химерного белка в патогенезе флГЦР [33]. На основании транскриптомного анализа предложен прогностический сет из 8 генов, экспрессия которых коррелирует с выживаемостью пациентов. Он включает регулятор активности PI3K/PEN сигнального пути PEAR, рецептор, ингибирующий NK-клетки KLRD1, регулятор белков семейства Ras RAPGEF1 и др. и позволяет разделить образцы флГЦР на группы с благоприятным и неблагоприятным прогнозом, критически отличающиеся по уровню средней выживаемости после хирургического лечения. Результаты геномного и транскриптомного секвенирования позволили предложить новые потенциальные терапевтические мишени для флГЦР — слитный белок DNAJB1-PRKACA с повышенной киназной активностью, мутации BRCA2 (4.2%), которые определяют возможность применения ингибиторов PARP, компоненты mTOR и EGF сигнальных путей, активация которых выявляется в 70% и 88% опухолей, соответственно [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные к настоящему времени результаты анализа геномных и транскриптомных нарушений при ГЦР свидетельствуют о том, что по спектру вызывающих его молекулярных событий этот тип опухолей является крайне гетерогенным. Дополнительным фактором, осложняющим выбор эффективной терапевтической стратегии является высокая гетерогенность опухолей, в том числе множественных узлов, выявляемых у одного пациента, свойственная прежде всего ГЦР, возникающим на фоне хронических инфекций вирусами гепатита В и С. Все эти факты указывают на то, что разделение случаев ГЦР на отдельные субклассы в зависимости от их этиологических, морфологических или генетических особенностей (хроническая инфекция HBV HCV, наличие цирроза, спектр драйверных генетических нарушений) может позволить оптимизировать подходы к выбору мишеней для направленной терапии, идентифицировать достоверные факторы прогноза внутри отдельных групп и существенно повысить эффективность лечения [34]. Кроме того, дополнительные успехи в идентификации ключевых механизмов гепатокацерогенеза и разработке эффективных методов лечения ГЦР могут быть достигнуты при исследовании взаимодействий опухолевых клеток со стромальным компонентом опухолей [35] и клетками, осуществляющими противоопухолевую защиту организма [36].

ЛИТЕРАТУРА

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2): 87–108.
2. Marquardt JU, Galle PR, Teufel A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): An emerging field for advanced technologies. *J Hepatol.* 2012; 56(1): 267–275.
3. Calvisi DF, Frau M, Tomasi ML, Feo F, Pascale RM. Deregulation of signalling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: Novel insights from interspecies comparison. *Biochim Biophys Acta — Rev Cancer.* 2012; 1826(1): 215–237.
4. Schulze K, Nault JC, Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol.* 2016. pii: S0168–8278(16)30249–5.
5. Han ZG. Functional Genomic Studies: Insights into the Pathogenesis of Liver Cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13(1): 171–205.
6. Lee JS, Chu IS, Heo J., Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology.* 2004; 40: 667–676.
7. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2009; 69: 7385–7392.
8. Boyault S, Rickman DS, De Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology.* 2007; 45: 42–52.
9. Villanueva A, Hoshida Y, Battiston C, Tovar V, Sia D, Alsinet C, et al. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2011; 140(5): 1501–12.e2.
10. Nault JC, De Reyniès A, Villanueva A, Calderaro J, Rebouissou S, Couchy G, et al. A hepatocellular carcinoma 5-gene score associated with survival of patients after liver resection. *Gastroenterology.* 2013; 145: 176–187.
11. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008; 359: 1995–2004.
12. Ji J, Yu L, Yu Z, Forgues M, Uenishi T, Kubo S, et al. Development of a miR-26 companion diagnostic test for adjuvant interferon-alpha therapy in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Sci.* 2013; 9(3): 303–12.
13. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene.* 2010; 29(16): 2309–2324.
14. Röcken C, Carl-McGrath S. Pathology and Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis.* 2001; 19(4): 269–278.
15. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 2014; 15(3): 266–282.
16. Marquardt JU, Seo D, Andersen JB, Gillen MC, Kim MS, Conner EA, et al. Sequential transcriptome analysis of human liver cancer indicates late stage acquisition of malignant traits. *J Hepatol.* 2014; 60(2): 346–53.
17. Nakashima O, Kojiro M. Recurrence of hepatocellular carcinoma: multicentric occurrence or intrahepatic metastasis? A viewpoint in terms of pathology. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001; 8(5): 404–409.
18. Miao R, Luo H, Zhou H, Li G, Bu D, Yang X, et al. Identification of prognostic biomarkers in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and stratification by integrative multi-omics analysis. *J Hepatol.* 2014; 61(4): 840–849.
19. Консервативное лечение первичного и метастатического рака печени / Под ред. В. А. Горбуновой. — 288 с., М.: 000 «Медицинское информационное агентство», 2013.
20. Xue R, Li R, Guo H, Guo L, Su Z, Ni X, et al. Variable Extent of Intra-tumor Heterogeneity Revealed by Genomic Sequencing of Multiple Lesions in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2016; 150(4): 998–1008.
21. Wang B, Xia CY, Lau WY, Lu XY, Dong H, Yu WL, et al. Determination of clonal origin of recurrent hepatocellular carcinoma for personalized therapy and outcomes evaluation: a new strategy for hepatic surgery. *J Am Coll Surg.* 2013; 217(6): 1054–1062.
22. Matsumoto Y, Fujii H, Matsuda M, Kono H. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma: diagnosis and clinical significance. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001; 8(5): 435–440.
23. Li Q, Wang J, Juzi JT, Sun Y, Zheng H, Cui Y, et al. Clonality analysis for multicentric origin and intrahepatic metastasis in recurrent and primary hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Surg.* 2008; 12(9): 1540–1547.
24. Lu LC, Hsu CH, Hsu C, Cheng AL. Tumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma: Facing the Challenges. *Liver Cancer.* 2016; 5(2): 128–138.
25. Arii S, Teramoto K, Kawamura T, Okamoto H, Kaido T, Mori A, Imamura M. Characteristics of recurrent hepatocellular carcinoma in Japan and our surgical experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001; 8(5): 397–403.
26. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992; 258(5083): 818–821.
27. Vogelstein B, Fearon ER, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science.* 1985; 227(4687): 642–645.
28. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research.* 1990; 18(24): 7213–7218.
29. Shi JY, Xing Q, Duan M, Wang ZC, Yang LX, Zhao YJ, et al. Inferring the progression of multifocal liver cancer from spatial and temporal genomic heterogeneity. *Oncotarget.* 2016; 7(3): 2867.
30. Liu S, Chan KW, Wang B, Qiao L. Fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 2009; 104: 2617–2624.
31. Honeyman JN, Simon EP, Robine N, Chiaroni-Clarke R, Darcy DG, Lim II, et al. Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Science.* 2014; 343(6174): 1010–1014.
32. Xu L, Hazard FK, Zmoos AF, Jahchan N, Chaib H, Garfin PM, et al. Genomic analysis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(1): 50–63.
33. Cornella H, Alsinet C, Sayols S, Zhang Z, Hao K, Cabellos L, et al. Unique genomic profile of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2015; S0016–5085(14)01580–7.
34. Chan SL, Wong AM, Lee K, Wong N, Chan AK. Personalized therapy for hepatocellular carcinoma: Where are we now? *Cancer Treat Rev.* 2016; 45: 77–86.
35. Heindryckx F, Gerwins P. Targeting the tumor stroma in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015; 7(2): 165–176.
36. Lavi O, Skinner J, Gottesman MM. Network features suggest new hepatocellular carcinoma treatment strategies. *BMC Syst Biol.* 2014; 8: 88.