

ФГБУ «НИИ онкологии
им. Н.Н. Петрова»
Минздравсоцразвития РФ

СТАНДАРТНЫЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРЕДИКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ ПРИ ОПУХОЛЯХ ЖЕЛУДОЧНО- КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Е.Н. Имянитов

*Разработка
и совершенствование
методов полногеномного
секвенирования
представляется главным
событием молекулярной
медицины после
изобретения ПЦР*

Введение

Опухоли желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) являются одним из наилучших примеров для демонстрации как успехов, так и проблем современной лекарственной терапии. Наиболее впечатляющий прогресс наблюдается для рака толстой кишки (РТК): если всего 20 лет назад средняя выживаемость пациентов с метастатическим РТК составляла около полугода, то с появлением новых препаратов - иринотекана, оксалиплатина, бевацизумаба и анти-EGFR антител – этот показатель стал превышать двухгодичную отметку [6, 13]. 4-кратное увеличение выживаемости – это фантастический прогресс! Представим, что в последующие 20 лет представится возможным сохранить подобную тенденцию и повысить выживаемость ещё в 4 раза – до 8 лет; этого окажется уже достаточным, чтобы большинство пациентов с метастатическим РТК успевали дожить до другой, «естественной» причины окончания жизни. Негативным аспектом, значительно осложняющим лечение больных с опухолями ЖКТ, является абсолютно диспропорциональное увеличение стоимости лекарств. Если в конце 1980 гг. этот показатель составлял примерно 100 долларов США в месяц, то сейчас применение таргетных препаратов и современных средств вспомогательной терапии может предусматривать ежемесячный бюджет в размере 10000 долларов и более. Применение предиктивных маркеров, позволяющих получать информацию о спектре лекарственной чувствительности опухоли в каждом конкретном клиническом случае, направлено на достижение лучшего баланса между клинической и экономической эффективностью лечения. Ожидается, что персонализированный подбор терапии на основе молекулярных тестов предоставит возможность увеличить частоту ответов на лечение и продолжительность жизни больных. Помимо этого, отказ от заведомо безрезультатных терапевтических схем подразумевает значительную оптимизацию расходов на лекарственные препараты [18].

РАК ТОЛСТОЙ КИШКИ

Фторпиримидины

Фторпиримидины (5-фторурацил (5-ФУ), капецитабин) можно рассматривать как «универсальный» противоопухолевый препарат – терапевтические схемы с применением лекарственных средств этой группы получают более половины всех онкологических больных. Переносимость и эффективность фторпиримидинов в значительной мере зависит от их системного и внутриопухолевого метаболизма. Ключевым ферментом распада 5-ФУ является дигидропиримидин-дегидрогеназа (DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase). Некоторые индивидуумы имеют наследственный дефект, в результате которого обе (отцовская и материнская) копии гена DPD не могут продуцировать нормальный белок. Подобные люди, составляющие около 0.1% популяции, характеризуются выраженной непереносимостью фторпиримидинов: первое же введение стандартной дозы 5-ФУ может привести к летальному исходу. Выявление лиц с системной инактивацией DPD требует полного секвенирования соответствующего гена. Данная разновидность молекулярно-генетического анализа до недавнего времени оставалась недоступной из-за колоссальной стоимости и трудоёмкости. Стремительное удешевление методик обнаружения мутаций вследствие появления технологий массивного

параллельного секвенирования позволяет надеяться, что исключение системного дефицита DPD войдёт в стандарты предварительного обследования онкологических больных уже в течение ближайших 3-4 лет. Следует оговориться, что генетическая инактивация DPD составляет не более половины всех случаев выраженной непереносимости фторпиримидинов, поэтому даже исчерпывающий анализ нуклеотидной последовательности данного гена не гарантирует полного отсутствия серьёзных осложнений от терапии 5-ФУ [40].

Совсем другим параметром, влияющим на исход лечения 5-фторурацилом и его производными, является внутриопухолевая активность DPD. Если системный дефицит DPD, определяемый наследственной мутацией в данном гене, представляет серьёзную опасность, то низкая активность DPD в самой опухолевой ткани способствует накоплению препарата внутри новообразования. Многие опухоли имеют пониженную экспрессию DPD по сравнению с нормальными тканями – именно эта особенность карцином создаёт определённое терапевтическое окно для фторпиримидинов. Многочисленные исследования показывают, что РТК с низким содержанием DPD демонстрируют более выраженный ответ на терапию 5-ФУ [23].

Другим молекулярным фактором, ассоциированным с чувствительностью РТК к 5-фторурацилу, является фермент тимидилат-синтаза (TS, thymidylate synthase). TS считается основной мишенью 5-ФУ. Высокая внутриопухолевая экспрессия TS зачастую сопряжена с резистентностью опухоли к фторпиримидинам. Это можно объяснить тем, что терапевтическая концентрация 5-фторурацила оказывается недостаточной для связывания избыточного количества молекул TS [27].

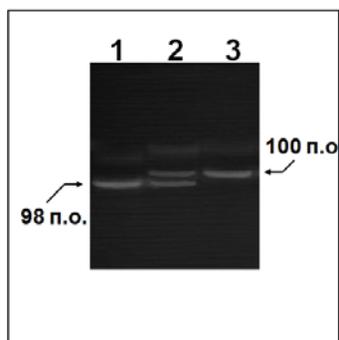
Многие исследования предиктивных маркеров ответа на лечение 5-ФУ включают другие ферменты-участники метаболизма фторпиримидинов, например OPRT (orotate phosphorybosyltransferase) [19]. В целом, развитие этой области клинической онкологии в последние годы не-

сколько приостановилось. Во-первых, 5-фторурацил и его производные стали значительно реже применяться в режиме монотерапии; соответственно, при ответе опухоли на назначение комбинации препаратов представляется затруднительным выявить, какой из компонентов лекарственной схемы оказал решающий вклад в успех лечения. Во-вторых, большинство исследователей предпочитают использовать для определения уровня экспрессии DPD, TS и других молекул наиболее простой и доступный метод – иммуногистохимию (ИГХ). К сожалению, именно ИГХ отличается плохой межлабораторной воспроизводимостью; это связано как с вариациями в спектре применяемых антител, так и со значительным субъективным компонентом в оценке интенсивности окрашивания. В-третьих, фторпиримидины являются «классическими» цитостатиками, поэтому их исследования не имеют поддержки со стороны крупных фармацевтических фирм.

Иринотекан

Включение иринотекана – ингибитора топоизомеразы I – в стандартные схемы лечения метастатического РТК привело к драматическому увеличению выживаемости этой категории больных. Однако первые же испытания данного препарата, осуществлённые ещё в начале 1990-х гг., продемонстрировали значительную популяционную вариабельность в отношении переносимости терапии. Дальнейшие исследования установили, что одним из главных параметров, детерминирующих выраженность побочных эффектов при назначении иринотекана, является полиморфизм гена UGT1A1. UGT1A1 характеризуется популяционным разнообразием в отношении количества динуклеотидных повторов ТА в промоторной (регуляторной) области гена. Наиболее частым является аллель, содержащий 6 повторов ТА. Примерно 25-40% аллелей UGT1A1 представлены версией с 7 ТА-динуклеотидами. Примечательно, что аллель (ТА)₇ (часто обозначаемый как UGT1A1*28) (рис. 1), ассоциирован с пониженной экспрессией соответствующего фермента,

Выявление аллеля UGT1A1*28



1 - генотип (ТА)₆(ТА)₆ (98 п.о.)
 2 - генотип (ТА)₆(ТА)₇ (98/100 п.о.)
 3 - генотип (ТА)₇(ТА)₇ (100 п.о.)

Рис.1. Идентификация полиморфных аллелей гена UGT1A1

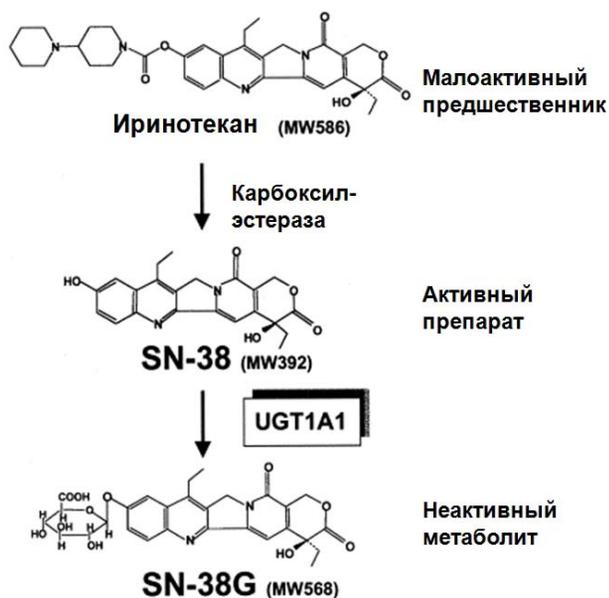


Рис.2. Метаболизм иринотекана

уридин-дифосфат-глюкуронозил-трансферазы 1A1 [19]. При гетерозиготном, и особенно при гомозиготном носительстве аллеля UGT1A1*28 нарушается соотношение между свободной и глюкурон-конъюгированной формой SN-38; как следствие, наблюдается заметное увеличение концентрации цитостатика в организме, что сопровождается усилением побочных эффектов лечения (рис. 2).

Подавляющее большинство исследователей сходится на том, что присутствие вариантных аллелей гена UGT1A1 сопряжено с повышенной токсичностью иринотекана. Воспроизводимость подобных наблюдений привела к тому, что тест на полиморфизм UGT1A1 в 2005 г. получил официальную поддержку со стороны Food and Drug Administration (FDA) [35]. Для пациентов, которые являются гомозиготными носителями аллеля UGT1A1*28, рекомендуется рассматривать вопрос о снижении стартовой дозировки препарата примерно на 20% [32]. Примечательно, что анализ гена UGT1A1 является первым фармакогенетическим тестом, рекомендованным к применению в терапии солидных опухолей.

Имеется небольшое число работ, посвящённых изучению не столько переносимости иринотекана, сколько анализу детерминант чувствительности РТК к этому препарату [17]. В частности, целый ряд предклинических и клинических наблюдений свидетельствует о том, что вероятность ответа на иринотекан может быть ассоциирована с внутриопухолевым уровнем экспрессии его мишени – топоизомеразы I. К сожалению, немногочисленность подобных исследований и разнородность методик определения статуса топоизомеразы I не позволяют сделать окончательных выводов по данному вопросу.

Оксалиплатин

Оксалиплатин по своей эффективности абсолютно сопоставим с иринотеканом и в большинстве случаев может являться его альтернативой при планировании лечения. В нашей стране он применяется несколько чаще

иринотекана – подобные предпочтения со стороны пациентов и врачей связаны с более низким риском алопеции и тяжёлой диареи. Тем не менее, именно выбор между оксалиплатином и иринотеканом представляется наглядным примером клинических ситуаций, когда анализ предиктивного маркера мог бы оказаться решающим звеном в определении тактики лечения. Значительное число публикаций посвящено перспективности использования экспрессионного статуса ERCC1 – фермента репарации ДНК – для прогнозирования эффективности данного препарата. Считается, что низкий уровень ERCC1 ассоциирован с большей вероятностью ответа на лечение. Тем не менее, работы в данной области сталкиваются с такими же трудностями, как и исследования по применению фторпиримидинов [19]. Экспрессия другого популярного предиктивного маркера для производных платины – BRCA1 – при РТК пока не изучалась.

Антитела к EGFR

Бесполезность иммуногистохимического определения уровня экспрессии EGFR

Антитела к EGFR – цетуксимаб и панитумумаб – вошли в стандарты лечения метастатического РТК в конце прошедшего десятилетия. Первые испытания этих препаратов организовывались по аналогии с наиболее успешными прототипами исследований таргетных лекарств – ингибиторов ароматазы и Герцептина. Идеология подобных клинических экспериментов предусматривает отбор на лечение только тех пациентов, опухоли которых действительно содержат белок-мишень; более того, карциномы с высокой экспрессией мишени (например, рецептора эстрогенов или тирозинкиназы HER2) обычно оказываются более чувствительными к специфическому препарату. Соответственно, наличие иммуногистохимического окрашивания опухоли по EGFR являлось обязательным условием включения больного в исследование. Однако, обработка результатов применения цетуксимаба и панитумумаба привела к совершенно неожиданным выводам: оказалось, что вероятность ответа на лечение ни в коей мере не зависит от уровня экспрессии EGFR. Более того, недавние проспективные исследования EGFR-негативных РТК выявили практически идентичные показатели эффективности анти-EGFR антител по сравнению с данными, полученными на EGFR-позитивных опухолях [5, 6, 16, 44].

Почему эффективность антагонистов EGFR не зависит от ИГХ-статуса белка-мишени?! По-видимому, в данном случае ИГХ-окрашивание не в полной мере коррелирует с ролью данного рецептора в патогенезе каждой отдельно взятой опухоли. Следует напомнить, что для тирозинкиназных рецепторов весьма характерно многообразие молекулярных изоформ. Не исключено, что доступные для ИГХ-анализа диагностические наборы не способны адекватно распознавать именно ту разновидность EGFR, которая ассоциирована с ответом на лечение. Помимо этого, сама система оценки результатов ИГХ может накладывать определённые ограничения. Это

предположение согласуется с тем фактом, что использование достаточно сложной и комплексной схемы интерпретации результатов ИГХ при испытаниях цетуксимаба на пациентах с раком лёгкого оказалось полезным для прогнозирования вероятности ответа на лечение [33]. Тем не менее, на сегодняшний день нужно твёрдо заявить, что практикуемое некоторыми врачами и лабораториями иммуногистохимическое исследование EGFR для отбора пациентов на терапию цетуксимабом и панитумумабом является грубой ошибкой, т.к. оно неизбежно приводит к ничем не обоснованной дискриминации пациентов с низким уровнем экспрессии EGFR в опухолевой ткани.

KRAS

KRAS является одним из первых идентифицированных онкогенов, чья причастность к опухолевому росту была продемонстрирована ещё в начале 1980-х гг. Название KRAS (Ki-ras, Ki-ras-2) происходит от онкогена, входящего в состав вируса крысиной саркомы Кирстен (Kirsten Rat Sarcoma). Человеческий KRAS был открыт на основании гомологии с соответствующим вирусным онкогеном. Существенно, что в геноме у человека имеются псевдогены KRAS, т.е. нуклеотидные последовательности, почти идентичные по своему составу «настоящему» гену KRAS; это обстоятельство может в значительной мере затруднять выявления мутаций KRAS. Помимо псевдогенов, существуют как минимум 2 гена, кодирующих сходные с KRAS белки: HRAS (Ha-ras) и NRAS [20].

Основная функция белков KRAS – участие в передаче сигнальных каскадов от мембранных рецепторов (рис. 3). Под каскадом подразумевается последовательная активация белков, находящихся в сигнальной цепочке и приводящая к какому-либо биологическому результату – например, делению клетки. В норме, в условиях многоклеточного организма, большинство сигнальных каскадов инициируются внешними сигналами. Так, запуск процессов пролиферации осуществляется посредством доставки к клеточной мембране эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF). EGF взаимодействует со своим рецептором и индуцирует димеризацию

последнего; в образующихся димерах каждая молекула EGFR фосфорилирует своего партнёра, что приводит к увеличению аффинности EGFR к белкам-мишеням. В частности, образуется комплекс с белками GRB2 и SOS, что, свою очередь приводит к активации белка семейства RAS (например, KRAS); KRAS активирует RAF (BRAF), затем RAF активирует MEK, MEK активирует MAPK, и т.д. Результатом этого сигнального каскада является удвоение клетки [28].

Активация EGFR (HER1) наблюдается в подавляющем большинстве опухолей эпителиального происхождения, в том числе и в РТК. В случае активации EGFR клетка становится независимой от стимулов, поступающих извне; действительно, EGFR начинает фосфорилировать молекулы-мишени вне зависимости от присутствия своего лиганда. Именно с этой особенностью связано фундаментальное свойство опухолевой клетки – способность самостоятельно, без какой-либо физиологической необходимости, генерировать сигналы к собственному делению и порождать клетки, обладающие такими же биологическим свойством. Если аутоstimуляция пролиферативного каскада действительно происходит по представленному сценарию, то терапевтическая инактивация EGFR может сопровождаться остановкой опухолевого роста [20, 28].

К сожалению, в реальной ситуации опухоли демонстрируют значительную молекулярную гетерогенность. Так, примерно 40% карцином толстой кишки содержит активирующую мутацию в онкогене KRAS. Эта мутация нарушает ГТФ-азную функцию белка, лишая KRAS способности к негативной ауторегуляции. Действительно, KRAS способен передавать сигналы только в том случае, если он находится в комплексе с ГТФ; подобный комплекс имеет очень короткий период полужизни, т.к. сам белок KRAS катализирует гидролиз ГТФ до ГДФ, и, таким образом, прекращает собственную биологическую активность. В случае мутации белок KRAS постоянно передаёт сигналы к делению, причём его состояние уже не зависит от статуса вышестоящих белков-регуляторов, в частности EGFR. Соответственно, скорость деления подобных опухолей остаётся неизменной даже при терапевтической инактивации EGFR, поэтому эта разновидность карцином толстой кишки оказывается практически нечувствительной к анти-EGFR антителам [37]. Именно поэтому все регистрационные документы по использованию цетуксимаба и панитумумаба требуют обязательного определения мутационного статуса KRAS; антитела к EGFR не могут назначаться пациентам с наличием мутации или неизвестным статусом KRAS. Примечательно, что KRAS-тестирование стало первым ДНК-анализом, включённым в стандарты клинической онкологии.

Вопрос о предиктивной роли KRAS не лишён некоторых небольших противоречий. Подавляющее число исследований цетуксимаба и панитумумаба предусматривало определение лишь наиболее частых мутаций, расположенных в кодонах 12 и 13. Помимо этого, до 5% РТК содержат мутации в позициях 61 и 146. Создаётся впечатление,

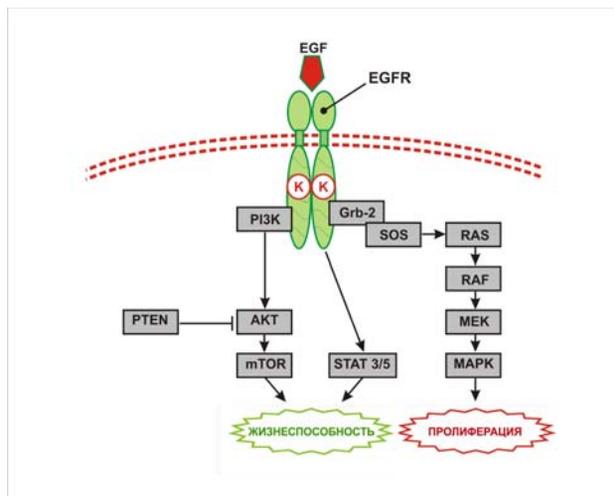


Рис.3. Сигнальный каскад EGFR

чатление, что мутации в кодоне 61 достоверно ассоциированы с резистентностью к анти-EGFR антителам. В то же время, вопрос о клинической значимости генетических повреждений в кодоне 146 остаётся открытым. Помимо обсуждения целесообразности включения в панель тестирования «минорных» сайтов мутаций, в литературе продолжается дискуссия о предиктивном статусе нуклеотидных замен в кодоне 13. Существуют исследования, доказывающие относительную чувствительность РТК с мутациями KRAS в 13-й позиции к назначению цетуксимаба. В то же время, многие клинические наблюдения отвергают подобную возможность. В заключение следует прокомментировать три аспекта продолжающихся исследований KRAS. Во-первых, любая презентация сигнальных путей (рис. 3) является лишь упрощённой схемой, предназначенной для наглядного изложения какой-либо проблемы; в реальности жизнеспособная клетка, особенно раковая, имеет огромное количество коллатеральных каскадов, способных компенсировать то или иное воздействие. Во-вторых, изучение относительно редких мутаций в KRAS может столкнуться с трудностями почти непреодолимого характера; например, представляется крайне сложным накопить критическую массу пациентов с мутациями в кодоне 146 для формирования окончательных выводов об их предиктивной значимости. В третьих, маркетинговая литература по цетуксимабу неизменно подчёркивает дополнительный компонент его противоопухолевого действия – т.н. антитело-опосредованную цитотоксичность, которая, по крайней мере в теории, не зависит от состояния сигнального каскада EGFR, и, следовательно, мутационного статуса KRAS. Нельзя исключить, что пограничные эффекты цетуксимаба, иногда наблюдаемые у пациентов с мутацией в кодоне 13, связаны именно с этим механизмом [6, 8, 43].

NRAS

NRAS является гомологом KRAS. Частота мутаций NRAS в карциномах толстой кишки обычно не превышает 5%. Существуют свидетельства, что мутации NRAS аналогичны по своей предиктивной значимости с повреждениями KRAS. Можно предполагать, что NRAS-тестирование в перспективе будет включено в стандарты обследования больных с метастатическим РТК для отбора пациентов на терапию анти-EGFR антителами [7].

BRAF

Онкоген BRAF кодирует молекулу, участвующую в передаче пролиферативного сигнала с мембранных тирозинкиназных рецепторов к ядру (рис. 3). Семейство киназ RAF представлено несколькими генами – ARAF, BRAF и CRAF. Мутационная активация описана к настоящему моменту только для одного из члена этого семейства – гена BRAF. Изменения последовательности BRAF как правило затрагивают 600-й кодон и встречаются примерно в 5% опухолей толстой кишки. В то время как нормальный BRAF активируется только при поступлении сигнала

от расположенного выше белка семейства RAS, повреждения гена BRAF приводят к автономной активации этой серин-треониновой киназы. В результате BRAF безостановочно передаёт стимулы к киназам MEK и MAPK, которые играют ключевую роль в запуске процессов клеточного деления. Мутационный статус генов BRAF и KRAS находится в реципрокных взаимоотношениях: если в РТК обнаруживается активация KRAS, присутствие нарушений в кодоне 600 гена BRAF практически исключено; напротив, если в опухоли наблюдается мутация KRAS, то статус BRAF почти всегда остаётся нормальным. Таким образом, частота мутаций BRAF в РТК с нормальным KRAS может приближаться к 10% [9].

Факт резистентности BRAF-мутированных РТК к цетуксимабу и панитумумабу почти не вызывает сомнений. Тем не менее, проблему клинической значимости статуса BRAF следует рассматривать значительно шире, чем просто в контексте целесообразности применения терапевтических антител. В частности, пациенты с мутацией BRAF делятся на 2 категории, абсолютно противоположные по своим клиническим характеристикам. Первую группу составляют крайне пожилые пациенты (75 лет и старше), опухоль которых содержит признаки гиперметилирования ДНК и характеризуется т.н. микросателлитной нестабильностью (MSI, microsatellite instability). Около половины старческих MSI-позитивных РТК содержат мутацию BRAF, однако такие больные почти никогда не попадают в клинические исследования: РТК с микросателлитной нестабильностью характеризуются благоприятным течением и метастазируют крайне редко. Другая категория РТК с мутацией BRAF представлена больными с очень плохим прогнозом; существует мнение, что такие карциномы резистентны не только к антагонистам EGFR, но и к любой терапии [39]. Вопрос о тактике лечения подобных больных остаётся открытым.

Недавние успешные испытания специфических ингибиторов BRAF у пациентов с BRAF-мутированной меланомой предоставили надежду, что аналогичный подход может применяться и для опухолей других локализаций. К сожалению, хотя правомерность этого предположения подтверждается отдельными клиническими наблюдениями в отношении рака лёгкого [12], исследование вемурафениба при BRAF-ассоциированном РТК закончилось негативными результатами. По-видимому, чувствительность опухоли к тому или иному таргетному препарату определяется не только статусом мишени, но и клеточным контекстом. Создаётся впечатление, что ингибирование активности мутированного BRAF достаточно для временной остановки роста меланомы, но требует обязательного комбинирования с другими препаратами при лечении рака толстой кишки [34].

PIK3CA и PTEN

Помимо непосредственного участия в процессах клеточного деления, активность EGFR способствует поддержанию клеточной жизнеспособности (survival). Участники этого сигнального каскада представлены на рис.

3. Около 20% РТК содержат мутации в гене PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonate 3-kinase, catalytic subunit alpha polypeptide gene), ассоциированные с активацией фосфоинозитол-3-киназы. Другим фактором, способствующим EGFR-независимому поддержанию жизнеспособности клетки, является инактивация фосфатазы PTEN. Ген PTEN может повреждаться посредством мутаций, гиперметилирования или делеций; зачастую в качестве свидетельства инактивации PTEN принимаются негативные результаты иммуногистохимического окрашивания этого белка. Некоторые исследования продемонстрировали причастность автономной активации сигнального пути, ассоциированного с жизнеспособностью клетки, к формированию резистентности к анти-EGFR терапии. Тем не менее, влияние статуса PIK3CA и PTEN на результаты лечения цетуксимабом или панитумумабом представляется менее значительным по сравнению с мутациями генов KRAS и BRAF, поэтому тестирование PIK3CA и PTEN при решении вопроса о назначении анти-EGFR антител считается нецелесообразным [9].

Авастин

Применение Авастина (бевацизумаба) в клинической практике связано с многочисленными заблуждениями. Мишенью данного препарата является фактор роста эндотелия – VEGF (vascular endothelial growth factor). Многочисленные попытки обнаружить ассоциации между эффективностью Авастина и уровнем VEGF или какими-либо другими молекулярными параметрами потерпели полную неудачу. Необходимо твердо понимать, что назначение бевацизумаба в настоящее время не сопровождается осуществлением тех или иных предиктивных тестов.

Scartozzi et al. недавно продемонстрировали предпочтительную эффективность комбинирования Авастина с химиотерапией у больных с высоким уровнем лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови [36]. Предполагается, что в данном случае ЛДГ выступает в качестве биохимического маркера гипоксии опухолевой ткани. Добавление Авастина к химиотерапии нормализует кровоснабжение опухоли и улучшает доставку цитостатиков в клетки новообразования, что и приводит к увеличению эффекта от лечения.

Микросателлитная нестабильность

Микросателлитная нестабильность представляется особой разновидностью молекулярного патогенеза опухолей толстой кишки. MSI-позитивные РТК характеризуются дефектом системы репарации неспаренных оснований ДНК и содержат тысячи микромутаций. Карциномы с микросателлитной нестабильностью могут демонстрировать резкий конфликт между морфологическими характеристиками и фактическим поведением новообразования. Микроскопическое исследование MSI-позитивных РТК часто выявляет исключительно низкую степень дифференцировки, что свидетельствует о зна-

чительной агрессивности опухоли. В то же время, РТК с микросателлитной нестабильностью крайне редко метастазируют, что, по-видимому, связано с их высокой иммуногенностью. Химиочувствительность этой категории РТК в значительной мере зависит от спектра мутаций, накопленных в ходе опухолевой прогрессии [15, 41].

MSI-позитивные карциномы толстой кишки делятся на 2 крайне непохожих друг на друга группы. До 20% новообразований с MSI составляют случаи синдрома Линча - наследственного неполипозного РТК; подобные пациенты характеризуются относительно молодым возрастом (до 40-45 лет), а их опухоль почти никогда не содержит мутаций в гене BRAF. Другую группу, о которой уже говорилось выше, составляют пожилые пациенты; мутации в гене BRAF наблюдаются примерно в половине старческих MSI-позитивных РТК [41].

Изучение лекарственной чувствительности опухолей с MSI сталкивается со значительными трудностями. Как упоминалось ранее, пациенты с MSI составляют ничтожную долю больных, включённых в клинические исследования по лекарственной терапии метастатического рака, при этом оценка результатов лечения осложняется молекулярной гетерогенностью данной категории неоплазм. Дополнительным препятствием является отсутствие стандартов определения MSI-статуса. Согласно современному консенсусу, радикально прооперированные больные с РТК второй стадии должны освобождаться от адьювантной химиотерапии в случае обнаружения микросателлитной нестабильности [41].

Аспирин и мутации PIK3CA

Абсолютно сенсационное исследование было недавно опубликовано Liao et al. [24]. Авторы в течение длительного промежутка времени наблюдали за судьбой пациентов, которые подверглись радикальному хирургическому лечению по поводу РТК. Часть больных регулярно принимала низкие дозы аспирина для профилактики инфаркта. Оказалось, что те пациенты, у которых в опухолевой ткани обнаруживалась мутация PIK3CA, практически не рецидивировали на фоне приёма данного препарата. В то же время, употребление аспирина не приводило к предотвращению рецидива у больных с интактным статусом PIK3CA. Более того, те пациенты, которые не применяли аспирин, характеризовались одинаковой вероятностью рецидива как при наличии мутации PIK3CA, так и без таковой. Эффект, обнаруженный Liao et al. [24], отличается экстраординарной степенью выраженности. Данное исследование безусловно получит широкий резонанс и, в случае воспроизводимости результатов, имеет хорошие шансы изменить клинические стандарты обследования и лечения больных РТК.

РАК ЖЕЛУДКА HER2

Наиболее заметным успехом прошедшего десятилетия является демонстрация эффективности Герцептина (трастузумаба) у самой тяжёлой категории пациентов с ра-

ком желудка (РЖ) – больных с HER2-позитивным заболеланием. Таким образом, РЖ стал вторым после рака молочной железы (РМЖ) зарегистрированным показанием к использованию анти-HER2 терапии. Частота активация HER2 при РЖ может приближаться к 20%. Следует подчеркнуть, что технические и организационные аспекты HER2-тестирования опухолей желудка заметно отличаются от таковых при РМЖ. Во-первых, если исследование РМЖ допускает использование FISH без иммуногистохимического исследования, то анализ состояния гена HER2 при РЖ всегда начинается с ИГХ. Во-вторых, для присвоения статуса 3+ опухоли желудка достаточно наблюдать выраженное окрашивание 10% исследованных клеток, в то время как HER2-тестирование РМЖ руководствуется более строгими критериями отбора пациентов на лечение (выраженное окрашивание не менее 30% клеток). В третьих, при исследовании карцином желудка не применяется требование к полному мембранному окрашиванию. В четвёртых, рекомендуется анализировать несколько участков опухоли (как минимум 6-8), при этом обнаружение активации гена HER2 даже в одном из изученных образцов расценивается как достаточное условие для назначения Герцептина [2, 4]. Таким образом, обычная морфологическая лаборатория, рутинно осуществляющая диагностику статуса HER2 для РМЖ, может оказаться не полностью готова к тестированию опухолей желудка. Врачи, направляющие морфологические препараты на исследование, должны убедиться, что анализ активации HER2 в РЖ будет выполняться в полном соответствии с существующими стандартами, а также предоставить лаборатории репрезентативную выборку биопсийных или хирургических препаратов от каждого больного.

BRCA1

Наши собственные исследования позволили установить, что примерно 2-4% больных заболевают раком желудка из-за присутствия наследственного дефекта в гене BRCA1 [1]. У подобных больных формируется уникальное терапевтическое окно для воздействия препаратов платины. В то время как здоровые клетки организма сохраняют одну интактную копию гена BRCA1, клетки опухоли характеризуются «потерей гетерозиготности» - утратой оставшегося BRCA1-аллеля. В результате трансформированные клетки, в отличие от здоровых, демонстрируют дефицит некоторых компонентов системы репарации ДНК. Это приводит к избирательной чувствительности клеток к воздействию производных платины. Наши собственные наблюдения показывают, что карциномы желудка у носителей мутации в гене BRCA1 отличаются необычно выраженными и длительными ответами на платиносодержащие схемы лечения [1].

Другим фактором, схожим по своей функциональной роли, является уровень внутриопухолевой экспрессии BRCA1. Многие карциномы желудка демонстрируют соматическую инактивацию BRCA1, ассоциированную с отсутствием продукции BRCA1-транскрипта. Подобные

новообразования также характеризуются повышенной чувствительностью к платиносодержащей терапии [1].

Другие маркеры

Существует ряд работ, посвящённых причастности статуса ферментов-участников метаболизма фторпиримидинов, прежде всего DPD и TS, к характеру ответа на терапию фторпиримидинами. В целом эти исследования зачастую не демонстрируют клинически значимых ассоциаций; по-видимому, неубедительный характер результатов по крайней мере отчасти связан с тем, что производные 5-фторурацила практически перестали использоваться в качестве монотерапии метастатического рака желудка [10].

Некоторые опухоли желудка являют проявлением синдрома Линча и демонстрируют микросателлитную нестабильность. MSI-позитивные РЖ изучены мало. Создаётся впечатление, что, как и в случае с РТК, присутствие MSI в карциномах желудка ассоциировано с низким уровнем дифференцировки опухоли и, вопреки морфологической картине, благоприятным течением заболевания.

РАК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ BRCA1, BRCA2 и PALB2

До 5-10% карцином поджелудочной железы вызвано присутствием генетического дефекта в одном из генов наследственного рака - BRCA1, BRCA2 или PALB2. Как уже упоминалось выше, подобные опухоли обычно демонстрируют высокую чувствительность к BRCA-специфическим препаратам - производным платины, ингибиторам PARP, митомицину и т.д. Опыт лечения наследственных раков поджелудочной железы уже представлен не только описаниями отдельных клинических случаев, но и анализом небольших групп пациентов [11, 26, 38, 42]. Относительная доступность соответствующего клинического материала объясняется тем фактом, что стандартные способы терапевтического лечения рака поджелудочной железы демонстрируют крайне низкую эффективность. Это обстоятельство предоставляет возможность для экспериментов, в частности для назначения индивидуальных комбинаций противоопухолевых препаратов при необычном проявлении данного заболевания.

РАК ПИЩЕВОДА

Роль молекулярных маркеров в формировании чувствительности и резистентности новообразований пищевода к противоопухолевой терапии изучена в значительно меньшей степени, чем для других частых карцином ЖКТ [10]. Обращает на себя внимание относительно высокая встречаемость в опухолях пищевода амплификаций генов, кодирующих рецепторные тирозинкиназы (EGFR, HER2, MET). Следует ожидать, что пациенты с активацией перечисленных рецепторов могут рассматриваться как кандидаты на лечение анти-EGFR антителами, Герцептином и кризотинибом, соответственно [22]. Другой интересной особенностью раков пищевода является относительно воспроизводимые сведения об обнаруже-

нии специфических мутаций в гене EGFR, ассоциированных с чувствительностью в гефитинибу и эрлотинибу [21, 25, 30].

РАК ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

Сведения о маркерах лекарственной чувствительности опухолей желчевыводящих путей ограничиваются отдельными публикациями. Например, Nakamura et al. описали благоприятное предиктивное значение низкого уровня экспрессии RRM1 (ribonucleotide reductase subunit M1) для терапии гемцитабином [31]. Вызывают интерес сведения об обнаружении перестроек гена ROS1 в холангиокарциномах [14]. Следует ожидать, что подобные опухоли могут оказаться чувствительными к терапии кризотинибом.

ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ

Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСТ) стали рассматриваться как отдельная нозологическая единица исключительно из практических соображений, с появлением сведений о необычайной чувствительности этих новообразований к терапии Гливекком (иматинибом). Однако, даже столь редкая группа неоплазм представляется достаточно неоднородной с точки зрения своих молекулярных характеристик. Значительная пропорция ГИСТ содержит активирующую мутацию в экзоне 11 онкогена KIT; подобные случаи характеризуются наибольшей чувствительностью к иматинибу. Если опухоль содержит другую разновидность мутации KIT или нуклеотидная последовательность данного гена остаётся интактной, то для таких больных рекомендуется рассматривать возможность 2-кратного увеличения дозы препарата. Небольшая часть ГИСТ характеризуется альтернативным вариантом молекулярного патогенеза, а именно мутационной активацией гена PDGFRA. Чувствительность PDGFRA-ассоциированных карцином к Гливекку

также зависит от внутригенной локализации мутации [29].

Перспективы

Разработка и совершенствование методов массивного параллельного секвенирования (секвенирования нового поколения) представляется главным событием молекулярной медицины после изобретения ПЦР. Этот метод предоставляет возможность в течении всего нескольких дней изучить полную нуклеотидную последовательность опухолевой ДНК и предоставить сведения об индивидуальном спектре мутаций для каждого пациента. Работы по полногеномному анализу опухолей стали появляться совсем недавно и пока носят характер сенсаций [3]. Одно из главных наблюдений, продемонстрированных в исследованиях подобного рода, заключается в неожиданно высокой частоте обнаружения «неканонических» предиктивных мутаций. Например, как уже упоминалось выше, небольшая часть опухолей ЖКТ может содержать генетические повреждения, характерные преимущественно для карцином лёгкого, и затрагивающие гены EGFR, ALK, ROS1 и т.д. Предполагается, что назначение в подобных случаях нестандартной для карцином желудочно-кишечного тракта терапии – гефитиниба, кризотиниба и т.д. – представляется более оправданным, чем использование традиционных схем лечения. Ожидается, что уже в ближайшие 3-5 лет полногеномный анализ опухолевой ДНК станет таким же рутинным компонентом обследования онкологических больных, как иммуногистохимическое исследование. Следует признать, что большинство практикующих врачей пока не в полной мере готовы к подобному сценарию развития клинической онкологии.

Благодарности

Данная работа выполнена при поддержке гранта Правительства Москвы (№ 15/12-Ген-М). Автор выражает сердечную признательность к.б.н. Е.Ш. Кулигиной за помощь в подготовке иллюстраций.

Литература

1. Волков Н.М. Поиск путей повышения эффективности рака желудка за счёт индивидуализации лечения на основе молекулярных маркеров. Автореф. канд. дисс., Санкт-Петербург: – 2010.
2. Albarello L., Pecciarini L., Doglioni C. HER2 testing in gastric cancer // *Adv. Anat. Pathol.* – 2011. – Vol.18. – P.53-59.
3. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer // *Nature.* – 2012. – Vol.487. – P.330-337.
4. Chua T.C., Merrett N.D. Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes—a systematic review // *Int. J. Cancer.* – 2012. – Vol.130. – P.2845-2856.
5. Chung K.Y., Shia J., Kemeny N.E., Shab M., Schwartz G.K., Tse A., Hamilton A., Pan D., Schrag D., Schwartz L., Klimstra D.S., Fridman D., Kelsen D.P., Saltz L.B. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol.23. – P.1803-1810.
6. De Mattos-Arruda L., Dienstmann R., Tabernero J. Development of molecular biomarkers in individualized treatment of colorectal cancer // *Clin. Colorectal. Cancer.* – 2011. – Vol.10. – P.279-289.
7. De Roock W., Claes B., Bernasconi D., De Schutter J., Biesmans B., Fountzilias G., Kalogeras K.T., Kotoula V., Papamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessevaux H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis // *Lancet. Oncol.* – 2010. – Vol.11. – P.753-762.

8. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab // *JAMA*. – 2010. – Vol.304. – P.1812-1820.
9. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer // *Lancet. Oncol.* – 2011. – Vol.12. – P.594-603.
10. Fareed KR, Kaye P, Soomro IN, Ilyas M, Martin S, Parsons SL, Madhusudan S. Biomarkers of response to therapy in oesophago-gastric cancer // *Gut*. – 2009. – Vol.58. – P.127-143.
11. Fogelman DR, Wolff RA, Kopetz S, Jawle M, Bradley C, Mok I, Cabanillas F, Abbruzzese JL. Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2-associated pancreatic cancer // *Anticancer. Res.* – 2011. – Vol.31. – P.1417-1420.
12. Gautschi O, Pauli C, Strobel K, Hirschmann A, Printzen G, Aebi S, Diebold J. A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib // *J. Thorac. Oncol.* – 2012. – Vol.7. – e23-24.
13. Glimelius B, Cavalli-Björkman N. Metastatic colorectal cancer: current treatment and future options for improved survival. Medical approach—present status // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2012. – Vol.47. – P.296-314.
14. Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, Wang Y, Deng G, Zhu L, Tan Z, Hu Y, Wu C, Nardone J, MacNeill J, Ren J, Reeves C, Innocenti G, Norris B, Yuan J, Yu J, Haack H, Shen B, Peng C, Li H, Zhou X, Liu X, Rush J, Comb MJ. Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma // *PLoS One*. – 2011. – Vol.6. – e15640.
15. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data // *Europ. J. Cancer*. – 2010. – Vol.46. – P.2788-2798.
16. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, Burris HA. 3rd, Swanson P, Lopez T, Buchanan G, Reiner M, Gansert J, Berlin J. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol.16. – P.2205-2213.
17. Ikeguchi M, Arai Y, Maeta Y, Ashida K, Katano K, Wakatsuki T. Topoisomerase I expression in tumors as a biological marker for CPT-11 chemosensitivity in patients with colorectal cancer // *Surg Today*. – 2011. – Vol.41. – P.1196-1199.
18. Imyanitov EN, Moiseyenko VM. Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations // *Clin. Chim. Acta*. – 2007. – Vol.379. – P.1-13.
19. Jensen NF, Smith DH, Nygerd SB, Rumer MU, Nielsen KV, Brünner N. Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2012. – Vol.47. – P.340-355.
20. Kranenburg O. The KRAS oncogene: past, present, and future // *Biochim. Biophys Acta*. – 2005. – Vol.1756. – P.81-82.
21. Kwak EL, Jankowski J, Thayer SP, Lauwers GY, Brannigan BW, Harris PL, Okimoto RA, Haserlat SM, Driscoll DR, Ferry D, Muir B, Settleman J, Fuchs CS, Kulke MH, Ryan DP, Clark JW, Sgroi DC, Haber DA, Bell DW. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol.12. – P.4283-4287.
22. Lennerz JK, Kwak EL, Ackerman A, Michael M, Fox SB, Bergethon K, Lauwers GY, Christensen JG, Wilner KD, Haber DA, Salgia R, Bang YJ, Clark JW, Solomon BJ, Iafrate AJ. MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophago-gastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol.29. – P.4803-4810.
23. Lenz HJ. Pharmacogenomics and colorectal cancer // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2006. – Vol.587. – P.211-231.
24. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K, Sun R, Nosho K, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Fuchs CS, Chan AT, Ogino S. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol.367. – P.1596-1606.
25. Liu QW, Fu JH, Luo KJ, Yang HX, Wang JY, Hu Y, Yang H, Bella E. Identification of EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* (in press).
26. Lowery MA, Kelsen DP, Stadler ZK, Yu KH, Janjigian YY, Ludwig E, D'Adamo DR, Salo-Mullen E, Robson ME, Allen PJ, Kurtz RC, O'Reilly EM. An emerging entity: pancreatic adenocarcinoma associated with a known BRCA mutation: clinical descriptors, treatment implications, and future directions // *Oncologist*. – 2011. – Vol.16. – P.1397-1402.
27. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pobl A, Zhang W, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol.8. – P.1000-1007.
28. Markman B, Javier Ramos F, Capdevila J, Tabernero J. EGFR and KRAS in colorectal cancer // *Adv. Clin. Chem.* – 2010. – Vol.51. – P.71-119.
29. Marrari A, Wagner AJ, Hornick JL. Predictors of response to targeted therapies for gastrointestinal stromal tumors // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2012. – Vol.136. – P.483-489.
30. Mir MM, Dar NA, Salam I, Shah ZA. Mutations in epidermal growth factor receptor gene in esophageal squamous cell carcinoma patients in kashmir- a high incidence area of India // *J. Health. Sci (Qassim)*. – 2008. – Vol.2. – P.17-25.
31. Nakamura J, Kobya N, Kai K, Obtaka K, Hashiguchi K, Hiraki M, Kitajima Y, Tokunaga O, Noshiro H, Miyazaki K. Ribonucleotide reductase subunit M1 assessed by quantitative double-fluorescence immunohistochemistry predicts the efficacy of gemcitabine in biliary tract carcinoma // *J. Oncol.* – 2010. – Vol.37. – P.845-852.

32. O'Dwyer PJ, Catalano RB. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol.24. – P.4534-4538.
33. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, de Marinis F, Eberhardt WE, Paz-Ares L, Störkel S, Schumacher KM, von Heydebreck A, Celik I, O'Byrne KJ. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study // *Lancet. Oncol.* – 2012. – Vol.13. – P.33-42.
34. Praballad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR // *Nature.* – 2012. – Vol.483. – P.100-103.
35. Ratain MJ. From bedside to bench to bedside to clinical practice: an odyssey with irinotecan // *Clin. Cancer. Res.* – 2006. – Vol.12. – P.1658-1660.
36. Scartozzi M, Giampieri R, Maccaroni E, Del Prete M, Faloppi L, Bianconi M, Galizia E, Loretelli C, Belvederesi L, Bittoni A, Cascinu S. Pre-treatment lactate dehydrogenase levels as predictor of efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal cancer patients // *Brit. J. Cancer.* – 2012. – Vol.106. – P.799-804.
37. Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy // *Ann. Surg. Oncol.* – 2010. – Vol.17. – P.1168-1176.
38. Sonnenblick A, Kadouri L, Appelbaum L, Peretz T, Sagi M, Goldberg Y, Hubert A. Complete remission, in BRCA2 mutation carrier with metastatic pancreatic adenocarcinoma, treated with cisplatin based therapy // *Cancer. Biol. Ther.* – 2011. – Vol.12. – P.165-168.
39. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schliching M, Zobel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol.29. – P.2011-2019.
40. Van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004;40:939-50.
41. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol.7. – P.153-162.
42. Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, De Jesus-Acosta A, Jones S, Maitra A, Hruban RH, Esbleman JR, Klein A, Laberu D, Donehower R, Hidalgo M. Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer // *Mol. Cancer. Ther.* – 2011. – Vol.10. – P.3-8.
43. Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S. Cetuximab: from bench to bedside // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2010. – Vol.10. – P.80-95.
44. Wierzbicki R, Jonker DJ, Moore MJ, Berry SR, Loebner PJ, Youssoufian H, Rowinsky EK. A phase II, multicenter study of cetuximab monotherapy in patients with refractory, metastatic colorectal carcinoma with absent epidermal growth factor receptor immunostaining // *Invest. New. Drugs.* – 2011. – Vol.29. – P.167-174.