

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский
национальный исследовательский медицинский центр Российской академии
наук»
(Томский НИМЦ)

На правах рукописи

КОЛЕГОВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ В
ПАТОГЕНЕЗЕ И ПРОГНОЗЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

Специальность: 14.01.12 – онкология

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
профессор Кондакова И.В.

доктор медицинских наук
Завьялов А.А.

Томск – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	13
1.1 Немелкоклеточный рак лёгкого	13
1.1.1 Клинико-эпидемиологические аспекты немелкоклеточного рака лёгкого	13
1.1.2 Комбинированное лечение немелкоклеточного рака лёгкого	14
1.2 Современные представления о патогенезе немелкоклеточного рака легкого	16
1.3 Белки клеточной подвижности.....	19
1.3.1 Характеристика белков клеточной подвижности и их участие в развитии злокачественных новообразований.....	19
1.3.2 Роль белков клеточной подвижности в патогенезе немелкоклеточного рака лёгкого	23
1.4 Система контроля качества клеточного протеома	25
1.4.1 Характеристика убиквитин-протеасомной системы и ее участие в развитии злокачественных новообразований.....	26
1.4.2 Характеристика кальпаиновой системы и ее участие в развитии злокачественных новообразований.....	29
1.4.3 Характеристика малого белка теплового шока HspB5 и его участие в развитии злокачественных новообразований.....	32
1.4.4 Участие белков системы контроля качества клеточного протеома в патогенезе немелкоклеточного рака лёгкого.....	35
1.5 Регуляция белков клеточной подвижности системой контроля качества клеточного протеома.....	36
Заключение по обзору литературы	38
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования.....	41
2.1 Клиническая характеристика больных	41
2.2 Материал исследования	44
2.3 Методы исследования	44
2.3.1 Получение осветленных гомогенатов	44
2.3.2 Определение активности протеасом и кальпаинов	44

2.3.3	Определение содержания субъединиц тотального пула протеасом, кофилина, фракций β -катенина	45
2.3.4	Определение уровня экспрессии мРНК кальпаинов 1 и 2, CAP1 и кофилина	46
2.3.5	Определение содержания белков CAP1 и HspB5	48
2.3.6	Статистическая обработка результатов	49
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение		50
3.1	Белки клеточной подвижности при немелкоклеточном раке легкого	50
3.1.1	Актин-связывающие белки в опухолевой и неизменной ткани легкого	50
3.1.2	Изменение актин-связывающих белков в зависимости от гистологического типа опухоли, распространенности опухолевого процесса	52
3.1.3	Актин-связывающие белки при проведении термохимиолучевой терапии	57
3.1.4	V-катенин в опухолевой и неизменной ткани легкого	60
3.1.5	Изменение β -катенина в зависимости от гистологического типа опухоли, распространенности опухолевого процесса	62
3.1.6	V-катенин при проведении термохимиолучевой терапии	66
3.2	Система контроля качества клеточного протеома при немелкоклеточном раке легкого	68
3.2.1	Протеасомы, кальпаины и HspB5 в опухолевой и неизменной ткани легкого	68
3.2.2	Протеасомы, кальпаины и HspB5 в зависимости от гистологического типа опухоли, распространенности опухолевого процесса	72
3.2.3	Протеасомы, кальпаины и HspB5 при проведении термохимиолучевой терапии	78
3.3	Регуляция белков клеточной подвижности системой контроля качества клеточного протеома.....	81
3.4	Связь белков клеточной подвижности и системы контроля качества клеточного протеома с безрецидивной, безметастатической и общей 2-х летней выживаемостью больных немелкоклеточным раком легкого	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		89
ВЫВОДЫ		96

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого является одной из часто встречающихся злокачественных опухолей и наиболее распространённой причиной смертности от онкологической патологии. Несмотря на разнообразие существующих методов диагностики, к моменту установления диагноза у 39,4% больных раком легкого уже выявляются метастазы [12]. Подавляющее большинство пациентов (до 70%) при первичном обращении имеют III стадию опухолевого процесса [19; 26]. Среди гистологических вариантов злокачественных опухолей легкого наиболее часто встречается немелкоклеточный рак (НМРЛ). Лечение больных НМРЛ по-прежнему остается предметом исследований и дискуссий. Основным и единственно радикальным методом лечения местнораспространенного рака легкого является хирургический, однако 5-летняя выживаемость на протяжении последних десятилетий не претерпела существенных изменений и находилась в прямой зависимости от стадии заболевания и гистологической структуры опухоли. Так, результаты 5-летней выживаемости после хирургического лечения местнораспространенного НМРЛ III стадии варьируют от 5 до 28% [12; 130].

В связи с этим в настоящее время активно развиваются методы комбинированного лечения НМРЛ, включающие рациональное сочетание радикального хирургического вмешательства с лучевой и/или лекарственной противоопухолевой терапией [6; 26]. Проведенные исследования, показали, что тримодальное лечение у больных НМРЛ III стадии достоверно улучшает 5-летнюю выживаемость более чем в 2 раза относительно только хирургического лечения [6; 55; 119]. Выбор метода лечения, несомненно, влияет на особенности течения и прогноз заболевания, во многом определяя вероятность опухолевой прогрессии.

Метастазирование и инвазивный рост, являясь основной характеристикой злокачественных новообразований, не изучены в достаточной мере на молекулярном уровне. В связи с этим необходимо изучение механизма формирования метастазов как для понимания закономерностей изменения

клеточных процессов при распространении опухолей, так и для разработки методов прогноза метастазирования. Значимыми процессами, определяющими метастатический потенциал опухолевых клеток, являются нарушение адгезивных свойств и способность к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которых играет реорганизация актинового цитоскелета. В этой связи наиболее актуально изучение актин-связывающих белков, к числу которых относятся циклаза-ассоциированный протеин 1 (САР1) и кофилин, а также белка, находящегося в комплексе с молекулами межклеточной адгезии - β -катенина. САР1 одним концом может с высоким сродством связываться с мономерами актина и разрывать его связи с белком твинфилином [117], другой же конец этого белка в клетке ассоциирован с кофилином [194], который играет важную роль в деполимеризации актина. Таким образом, САР1 ускоряет обусловленную кофилином разборку актиновых филаментов и освобождает мономеры актина с последующей их полимеризацией для формирования актин-богатых структур, таких как филоподии и ламеллоподии [193; 181]. Также большое влияние на процессы локомоции и адгезии оказывает β -катенин. Находясь в составе катенин-кадгериновых комплексов, β -катенин участвует в формировании межклеточных контактов. При их нарушении β -катенин освобождается из связи с E-кадгерином и фосфорилируется по остатку серина 45. Уменьшение количества мембранных катенин-кадгериновых комплексов сопровождается накоплением фосфорилированного β -катенина в цитозоле с последующим его перераспределением в ядро, где он участвует в активации TCL/LEF транскрипционных факторов, что вызывает повышение пролиферативной и миграционной активности клеток [16]. В настоящее время не достаточно изучена возможная регуляция данных белков при метастазировании НМРЛ.

Для сохранности клеточного протеома, нормального функционирования клеток и регуляции их биологического ответа существует система контроля качества клеточного протеома, включающая молекулярные шапероны и энергозависимые протеазы [18]. Молекула HspB5 (α B-кристаллина) – малого белка теплового шока – является истинным шапероном и при этом ассоциирована

с лимфогенным и гематогенным метастазированием при опухолевых заболеваниях [169]. HspB5 может взаимодействовать с компонентами цитоскелета и, таким образом, влиять на пространственно-временную организацию клетки, например, может связывать и стабилизировать F-актин и предотвращать его деполимеризацию. HspB5 также является шапероном для некоторых актин-связывающих белков, к числу которых относятся CAP1 и кофилин [37]. Кроме того, существуют данные о комплексной работе HspB5 с протеасомной протеолитической системой, так как белки теплового шока могут поставлять белки-субстраты на деградацию в протеасомную систему в клетке [37]: HspB5 – часть комплекса, участвующего в полиубиквитинировании молекулы, которая является своеобразной меткой для дальнейшей деградации белка 26S протеасомой [86]. Также α B-кристаллин может помогать 20S протеасоме деградировать меченые белки в отсутствие 19S регуляторного комплекса или системы убиквитинирования [161].

Внутриклеточные протеолитические системы, такие как убиквитин-протеасомная и кальпаиновая, самостоятельно участвуют в деградации белков актинового цитоскелета, в том числе актин-связывающих белков, таких как филамины, гельзолин и кофилин [74; 124; 186]. Существуют данные об активном участии протеасом и кальпаинов в деградации некоторых белков, играющих важную роль в процессе метастазирования, таких как β -катенин [106]. Для кальпаиновой системы белки цитоскелета клетки вообще являются физиологическими субстратами [67], что объясняет ее ассоциацию с регионарным и отдаленным метастазированием опухолей разных локализаций [23; 24; 100; 101]. Доказано, что процесс развития опухоли тесно связан с функционированием протеолитических систем. Шапероны и системы протеолиза участвуют в регуляции пролиферативной активности, дифференцировки, миграции, транскрипции генов, ингибировании апоптоза, стимуляции неоангиогенеза и функционировании иммунной системы [37]. Все выше сказанное свидетельствует о том, что изучение роли белков CAP1, кофилина, β -катенина, участвующих в инвазии и миграции опухолевых клеток, их возможных

регуляторов белка теплового шока HspB5, протеасомной и кальпаиновой протеолитических систем позволило бы выявить новые молекулярные механизмы регуляции процессов адгезии и локомоции клеток рака легкого, которые вносят значимый вклад в процесс метастазирования.

Таким образом, представленная выше информация свидетельствует о том, что, хотя функция белков клеточной подвижности, внутриклеточных протеолитических систем и белков теплового шока в нормальных и опухолевых клетках достаточно хорошо изучена, однако в целом их взаимодействие и функционирование в метастазировании раковых опухолей, в общем, и НМРЛ, в частности, окончательно не ясно. Комплексное изучение функционирования белков CAP1, кофилина, фосфорилированной и общей форм β -катенина, участвующих в инвазии и миграции опухолевых клеток, их возможных регуляторов белка теплового шока HspB5 протеасомной и кальпаиновой протеолитических систем позволило бы выявить новые молекулярные механизмы регуляции процессов адгезии и локомоции клеток рака легкого, которые вносят значимый вклад в процесс метастазирования. Также актуальным в настоящее время представляется важным изучение особенностей функционирования белков, ответственных за клеточную подвижность, и регулирующих их систем в ткани НМРЛ в зависимости от проводимой терапии и исхода заболевания. Изучение данных молекулярных показателей может послужить основой для разработки новых маркеров, позволяющих прогнозировать течение рака легкого.

Цель: изучить белки клеточной подвижности, их регуляцию и определить прогностическую значимость при прогрессировании у больных немелкоклеточным раком легкого.

Задачи исследования:

1. Определить уровень мРНК и содержание актин-связывающих белков (CAP1 и кофилина), уровень фракций β -катенина, белка теплового шока HspB5, активность протеасом и кальпаинов, содержание общего пула протеасом, экспрессию мРНК кальпаина 1 и 2 в неизменной ткани легкого, в опухоли и в лимфогенных метастазах у больных раком легкого.

2. Оценить связь изучаемых показателей с основными клинико-морфологическими параметрами опухолевого процесса.

3. Изучить изменение экспрессии мРНК и содержания белков клеточной подвижности и характеристики компонентов системы контроля клеточного протеома при проводимой терапии.

4. Определить взаимосвязь между содержанием молекулярных показателей для оценки возможных механизмов регуляции белков клеточной подвижности в тканях первичной опухоли и метастазах в регионарных лимфоузлах.

5. Определить прогностическую значимость белков клеточной подвижности и регулирующих их систем в отношении исхода заболевания (2-х летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости) у больных немелкоклеточным раком легкого.

Научная новизна

Впервые исследованы белки клеточной подвижности (CAP1, кофилин, фосфорилированная и общая формы β -катенина) и функционирование компонентов системы контроля качества клеточного протеома (протеасом, кальпаинов и HspB5) в тканях у больных НМРЛ и показано увеличение содержания белков клеточной подвижности, а также усиление протеасом- и кальпаин-зависимого протеолиза в опухоли по сравнению с неизменной тканью легкого.

Впервые установлено повышение уровня CAP1 и снижение содержания кофилина при росте экспрессии их мРНК, а также увеличение фосфорилированной фракции β -катенина на фоне снижения его общей фракции и снижение активности кальпаинов в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов при увеличении критерия T. Впервые показано повышение уровня CAP1 и его мРНК в опухолевой ткани при лимфогенном метастазировании НМРЛ. Было выявлено нелинейное изменение уровня кофилина, его мРНК, фракций β -катенина и активности протеасом в зависимости от N.

Впервые изучаемые показатели оценены при проведении термохимиолучевой терапии (ТХЛТ) и показано, что белки изменяются на фоне ТХЛТ в регионарных лимфоузлах: снижается уровень САР1 на фоне повышения экспрессия его мРНК; повышается общая фракция β -катенина при снижении его фосфорилированной формы; а также повышается активность протеасом и кальпаинов, содержание HspB5.

Впервые в тканях НМРЛ выявлена связь между активностью внутриклеточных протеиназ и содержанием белков клеточной подвижности: показано возможное участие химотрипсинподобной активности протеасом в деградации β -катенина; каспазаподобной активности протеасом – САР1 и кофилина; активности кальпаинов – кофилина.

Впервые показано, что высокая активность протеасом является неблагоприятным фактором в отношении общей выживаемости; высокий уровень САР1 – неблагоприятным фактором в отношении безметастатической выживаемости.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные имеют фундаментальную значимость для понимания молекулярных механизмов прогрессирования НМРЛ. Получены новые знания о вероятных механизмах регуляции содержания белков, ответственных за подвижность и адгезию, протеолитическими системами в тканях рака легкого.

Практическую значимость работы составляют результаты исследования, которые могут послужить дополнительными критериями прогноза течения НМРЛ. Полученные данные о повышении общей и безметастатической двухлетней выживаемости больных при низких активности протеасом и уровня САР1 свидетельствуют о возможности использования этих показателей в качестве новых кандидатных маркеров для оценки прогноза течения заболевания больных НМРЛ после операции.

Положения, выносимые на защиту

1. Содержание белков клеточной подвижности (САР1, кофилина, фосфорилированной и общей форм β -катенина) и активность внутриклеточных протеолитических систем (протеасом и кальпаинов) увеличиваются в опухолевой ткани НМРЛ по сравнению с неизмененной тканью и изменяются при лимфогенном метастазировании.

2. Существуют связи активности протеасом и уровня белков клеточной подвижности САР1, кофилина и β -катенина; кальпаинов и уровня актин-связывающего белка кофилина.

3. Определение уровня САР1 и активности протеасом в ткани первичной опухоли НМРЛ дает возможность прогнозировать развитие неблагоприятного исхода и безметастатическую выживаемость у больных НМРЛ в послеоперационном периоде.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном клиническом материале с использованием современных и высокотехнологичных молекулярно-биологических методов исследований. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины.

Результаты проведенного исследования докладывались и обсуждались на Всероссийских конференциях молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В.Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2016-2017), Международной конференции «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (г. Томск 2017), Объединенном научном форуме, международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (г. Москва, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (г. Томск, 2017), Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (г. Томск,

2018), IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2018» (г. Санкт-Петербург, 2018)

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: Грант № 17-304-50020 мол_нр «Функционирование протеасом и кальпаинов в опухолевой прогрессии немелкоклеточного рака легкого», Грант РФФИ № 18-415-703003 р_мол_а «Роль актин-связывающих белков в формировании метастазов немелкоклеточного рака легкого». Получена стипендия Президента РФ молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018) в рамках темы научного исследования: Разработка технологии прогнозирования злокачественных метастазов немелкоклеточного рака легкого.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицу и иллюстрирована 23 рисунками. Библиография включает 195 литературных источников, из которых 30 отечественных и 165 иностранных.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Немелкоклеточный рак лёгкого

1.1.1 Клинико-эпидемиологические аспекты немелкоклеточного рака лёгкого

В структуре онкологической заболеваемости населения мира ведущую позицию занимают новообразования трахеи, бронхов, легкого [19; 165], которые являются одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем в мире. В Российской Федерации в 2016 году рак трахеи, бронхов, легкого занимал третье место в общей структуре онкологической заболеваемости. При этом, на протяжении десяти лет злокачественные опухоли легкого занимают первое место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями мужского населения России, а в структуре заболеваемости женского населения – из года в год заболеваемость растет [12].

В связи с тем, что заболевание на ранних стадиях обычно протекает бессимптомно, в большинстве случаев рак легких диагностируется при значительном местном распространении или наличии отдаленных метастазов (57%). Данные показатели запущенности заболевания непосредственно влияют на результаты лечения и обуславливают высокие показатели смертности. Пятилетняя выживаемость при локализованном процессе составляет 55%, при местнораспространенном процессе - 27%, и 4% при наличии отдаленных метастазов [119].

Существует несколько классификаций рака легкого. Наиболее часто на практике используют TNM и гистологическую классификацию; эти классификации учитывают распространенность, агрессивность опухолевого процесса и особенности морфологического строения опухоли.

В зависимости от гистологического строения опухоли [166] выделяют: плоскоклеточный, мелкоклеточный, аденокарциному, крупноклеточный и

смешанный тип. Часто используется понятие «немелкоклеточный рак легкого» (НМРЛ), объединяющее все гистологические типы, за исключением мелкоклеточного варианта [26]. НМРЛ обладает относительно более благоприятным прогнозом, менее агрессивным течением и большей частотой встречаемости, чем мелкоклеточный рак [144].

Таким образом, НМРЛ – это гетерогенное заболевание, которое занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости в России и мире, что обосновывает актуальность изучения механизмов развития данного заболевания, а также поиск новых критериев оценки его течения.

1.1.2 Комбинированное лечение немелкоклеточного рака лёгкого

Лечение больных местнораспространенным НМРЛ по-прежнему остается предметом исследований и дискуссий. На сегодняшний день основным методом лечения остается хирургический, однако 5-летняя выживаемость на протяжении последних десятилетий не претерпела существенных изменений и находилась в прямой зависимости от стадии заболевания и гистологической структуры опухоли. Так, результаты 5-летней выживаемости после хирургического лечения местнораспространенного НМРЛ III стадии варьируют от 5 до 28%. При этом даже на ранних стадиях опухолевого процесса после проведенного лечения отмечается высокий процент рецидивов и метастазов (60–64%) [12]. В связи с этим в настоящее время активно развиваются методы комбинированного лечения НМРЛ, включающие рациональное сочетание радикального хирургического вмешательства с лучевой и/или лекарственной противоопухолевой терапией [26; 162]. Проведенные исследования, показали, что тримодальное лечение у больных НМРЛ III стадии достоверно улучшает 5-летнюю выживаемость более чем в 2 раза относительно только хирургического лечения [55]. Выбор метода лечения, несомненно, влияет на особенности течения и прогноз заболевания, во многом определяя вероятность опухолевой прогрессии.

Основная задача предоперационной терапии состоит в повреждении опухолевых клеток, снижении степени их злокачественности, санации лимфатических путей корня легкого и средостения для предупреждения лимфо- и гематогенного метастазирования и, следовательно, рецидива болезни [20]. При использовании химио- и лучевой терапии в предоперационном периоде наблюдается лучшая переносимость, чем в послеоперационном, повышается ее эффективность при неизменном кровоснабжении опухоли до операции, а также повышается возможность проведения всех запланированных курсов химиотерапии. Эффективность предоперационной химио-, лучевой терапии определяется уменьшением размеров опухоли, повышением операбельности опухоли, ликвидации и профилактики микрометастазов [162; 191].

Уже в течение длительного времени в химиотерапии пациентов с НМРЛ лекарственными средствами первой линии являются препараты платины [20, 105]. Изначально, пациенты НМРЛ с метастазами в лимфоузлах уровня N₂ имели плохие результаты после одномоментного либо только операционного лечения, либо лучевой терапией [87]. Параллельная химиотерапия плюс лучевая терапия значительно улучшили выживаемость и теперь являются стандартным методом лечения НМРЛ при N₂ стадии заболевания [6, 93].

Несмотря на совершенствование хирургических методов лечения, применение неоадьювантного и адьювантного вариантов лечения все еще существуют большие трудности в значимом улучшении выживаемости при НМРЛ. Эффективность терапии НМРЛ ограничивается лекарственной устойчивостью, то есть феноменом невосприимчивости опухоли к лечебному воздействию. Это явление может объясняться различными молекулярно-генетическими механизмами, используемыми опухолевой клеткой. Примерами таких механизмов лекарственной устойчивости могут быть мутации генов, ответственных за клеточный цикл и апоптоз; генов репарации ДНК; активация белков-транспортеров или белков, ответственных за клеточный метаболизм [5].

Изучение молекулярных факторов, влияющих на опухолевую прогрессию, является потенциально перспективным подходом для получения новых мишеней

для прогнозирования риска метастазирования прооперированных больных и поиска новых противоопухолевых препаратов.

1.2 Современные представления о патогенезе немелкоклеточного рака легкого

НМРЛ является актуальной социально-биологической проблемой. Отсутствие заметных достижений в борьбе против рака легкого в значительной мере обусловлено недостаточным уровнем познания в этиологии и патогенезе данного заболевания. Анализ существующих представлений о происхождении НМРЛ показывает, что в настоящее время нет удовлетворительных концепций, объясняющих развитие рака легкого. В научном мире обсуждаются различные гипотезы, но они не являются исчерпывающими.

Клинико-генеалогические исследования свидетельствуют о наличии случаев семейного рака легкого [30]. Согласно эпидемиологическим наблюдениям, прослеживаются половые различия в заболеваемости тем или иным морфологическим вариантом рака легкого. Плоскоклеточный рак ассоциирован с курением и является преобладающим типом среди мужчин, в то время как развитие аденокарциномы, чаще встречающейся у женщин, в наименьшей степени среди всех гистологических вариантов немелкоклеточного рака легкого связано с курением [2]. В экспериментах на животных показано, что ткань легкого является гормонально зависимой [61]. Женщины, принимающие эстрогены в рамках гормонозаместительной терапии, подвержены повышенному риску развития рака легкого, главным образом аденокарциномы [64]. Благодаря успехам молекулярной биологии и генетической инженерии в настоящее время удалось обнаружить и охарактеризовать ряд вирусных и клеточных онкогенов, вовлеченных в процессы канцерогенеза [30]. В итоге, в настоящее время к главным факторам патогенеза рака можно отнести следующие молекулярно-генетические изменения: активирующие мутации в онкогенах, инактивирующие мутации в антионкогенах и геномная нестабильность [9].

Спектр генетических повреждений в опухолях разнообразен. К таковым относятся амплификации, делеции, инсерции, транслокации, микромутации. В последнее время большое внимание уделяется наследуемым изменениям в уровне экспрессии генов, что связано с аномальным метилированием их промоторов [7]. Важную роль при НМРЛ, учитывая его ассоциацию с курением, играет полиморфизм генов ферментов ксенобиотического метаболизма. Канцерогены табачного дыма подвергаются в организме сложным метаболическим превращениям при участии цитохромов. Люди, унаследовавшие малоактивные варианты цитохромов, могут отличаться относительной низкой резистентностью к канцерогенам табачного дыма. В частности, получены данные об ассоциации полиморфизма гена CYP1A1 с повышенным риском рака легкого [83]. Инактивация полициклических углеводов обеспечивается семейством глутатионтрансфераз (GSTM1). Индивидуумы, у которых отсутствует ген глутатион-трансферазы характеризуются большей предрасположенностью к раку легкого [85]. Также большое внимание уделяется наследственным особенностям систем репарации ДНК. Наиболее изученными представляются полиморфизмы генов XPD/ERCC2, XRCC1, XRCC3, hOGG1, однако модифицирующее влияние на риск развития НМРЛ подтвердилось только для гена hOGG1 [180].

Для опухолей характерна аутокринная активация множественных сигнальных каскадов. В большинстве случаев рака легкого наблюдается избыточность сигналов, посылаемых рецепторными тирозинкиназами, в частности от рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [145]. Наряду с аутокринными процессами опухоли легкого могут провоцировать паракринные механизмы. В частности, экспрессия перипухолевыми фибробластами ростового фактора гепатоцитов HGF (hepatocyte growth factor) сопровождается активацией тирозинкиназного рецептора MET, расположенного на мембране опухолевых клеток. От мембранных рецепторов сигнал передается по так называемому RAS/RAF/MEK/MAPK-каскаду. Примечательно, что активация упомянутого каскада может происходить и без вовлечения рецепторов, например вследствие

мутации в генах семейства RAS. В результате мутации белки RAS теряют способность гидролизовать связанный с ними ГТФ в ГДФ, что сопровождается утратой механизма негативной ауторегуляции [115].

Практически во всех случаях РЛ наблюдается инактивация супрессорных биохимических каскадов. В частности, нарушения в работе сигнальных путей, ассоциированных с белками RB1 и p53, приводят к безостановочному делению клетки вследствие потери контроля над клеточным циклом. Инактивация p53 также сопровождается угнетением процессов программируемой клеточной гибели, что способствует возникновению новых онкоассоциированных мутаций [61].

Высокая агрессивность НМРЛ связана с опухолевой прогрессией, основными характеристиками которой являются инвазия и метастазирование. Одним из наиболее значимых процессов, определяющих метастатический потенциал опухолевых клеток, является нарушение адгезивных свойств и способность к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которой играет реорганизация актинового цитоскелета. Этот этап развития злокачественных опухолей получил название «эпителиально-мезенхимальный переход» (ЭМП), он характеризуется потерей раковыми клетками эпителиальной морфологии и приобретением характеристик, свойственных мезенхимальным клеткам, таких как веретенообразная форма, потеря молекул межклеточной адгезии, способность активно перестраивать свой цитоскелет [141].

При этом происходит разрушение межклеточных связей и реорганизация цитоскелета, что приводит к значительному повышению клеточной подвижности. В регуляции клеточной миграции и инвазии принимают участие различные сигнальные пути, одним из главных модуляторов этих процессов считают TGF- β , отчасти благодаря его ведущей индукторной роли в развитии ЭМП [121]. Действие TGF- β реализуется через два его рецептора (серин-треониновые киназы), которые затем активируют цитоплазматические Smad белки, а также в меньшей степени через активацию Smad-независимых путей. Многие компоненты TGF- β /Smad сигнального пути подвержены протеасомной деградации [66]. Один из

Smad-независимых путей приводит к деградации RhoA, что ведет к диссоциации плотных контактов, ингибированию клеточной адгезии, полимеризации F-актина [52].

Другим важным фактором, способствующим ЭМП и метастазированию, являются репрессоры транскрипции Snail (Snail1 и Slug), регулирующие многие эффекторы ЭМП. Так, повышенная экспрессия Snail ассоциирована с утратой экспрессии E-кадгерина, осуществляющего межклеточные адгезионные контакты. Важная роль Snail в опухолевой прогрессии показана, где клетки, экспрессирующие Snail, демонстрировали большой миграторный потенциал, а также коррелировали со стадией и метастазами в лимфоузлы [44]. Экспрессия Snail также связана с активностью NF-κB и Vmi-1 [182].

Таким образом, патогенез НМРЛ включает гетерогенные механизмы. Изучение механизма формирования метастазов необходимо как для понимания закономерностей изменения клеточных процессов на молекулярном уровне при распространении опухолей, так и для разработки диагностических подходов по прогнозу риска метастазирования, профилактике и лечению метастатической болезни.

1.3 Белки клеточной подвижности

1.3.1 Характеристика белков клеточной подвижности и их участие в развитии злокачественных новообразований

Основной причиной летальных исходов при злокачественных новообразованиях является опухолевая прогрессия, основными характеристиками которой являются инвазия и метастазирование. Большое влияние на процессы локомоции и адгезии оказывает β-катенин – белок адгерентных контактов [94]. Находясь в составе катенин-кадгериновых комплексов, β-катенин участвует в формировании межклеточных контактов, а также связан с нитями актина, оказывая прямое влияние на реорганизацию актиновых филаментов. При нарушении межклеточных контактов β-катенин является сигнальной молекулой

Wnt/ β -катенин сигнального пути. В трансформированных клетках β -катенин выводится из связи с E-кадгерином и фосфорилируется по остатку серина 45. Уменьшение количества мембранных катенин-кадгериновых комплексов сопровождается накоплением фосфорилированного β -катенин в цитозоле с последующим его перераспределением в ядро, где он участвует в активации TCL/LEF транскрипционных факторов, что вызывает повышение пролиферативной и миграционной активности клеток [16].

Согласно современным данным, мутации, приводящие к аномальному Wnt-сигналлингу играют ключевую роль в развитии различных опухолей [129]. Ряд исследований показали, что β -катенин является ключевым модулятором пролиферации и выживания опухолевых клеток [167]. Также было обнаружено, что данный белок способен поддерживать рост опухоли путем стимуляции ангиогенеза за счет участия в регуляции экспрессии эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) [146]. β -катенин участвует в механизмах метастазирования опухолей, усиливая способность клеток к миграции и инвазии. В частности, он регулирует экспрессию генов матриксных металлопротеиназ (MMP2, MMP7, MMP9, MMP26), продукты которых играют роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференцировке клеток, апоптозе [137]. Кроме того, изменяя экспрессию генов-мишеней в фибробластах, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках, эндотелиальных клетках, β -катенин влияет на опухолевое микроокружение, что имеет прямое значение для роста и прогрессии злокачественной опухоли [63; 171]. Нарушения сигнальной и адгезивной функции β -катенина выявлены при колоректальном раке, гепатоцеллюлярном раке, раке предстательной железы, раке щитовидной железы и некоторых других вариантах неоплазий [97; 129].

Помимо уменьшения количества межклеточных контактов в формировании способности к локомоции важную роль внутри клетки играет реорганизация актинового цитоскелета клеток. Более 100 белков в цитоплазме связываются с актином, выполняя различные функции: регулируют объем G-актинового пула, влияют на скорость полимеризации, стабилизируют концы нитей, сшивают

филаменты друг с другом, разрушают двойную спираль F-актина. Активность этих белков регулируется Ca^{2+} и протеинкиназами. Эти белки имеют свою точку приложения: с мономером актина, с (+)-концом (оперенный), с (-)-концом (заостренный), с боковой поверхностью [3].

Одним из малоизученных у человека актин-связывающих белков является циклаза-ассоциированный протеин CAP1. Циклаза-ассоциированный протеин (Cyclase-associated protein - CAP) – мультидоменный белок, который впервые был идентифицирован как компонент аденилат-циклазного комплекса в дрожжах [60], откуда и получил свое название, хотя, на данный момент, роль CAP в передаче сигналов с участием аденилатциклазы описана только для некоторых одноклеточных эукариот и прокариот. Были получены только косвенные доказательства взаимосвязи CAP с аденилатциклазой 1 типа на культурах клеток млекопитающих. В опухолевой ткани колоректального рака было отмечено одновременное снижение экспрессии генов *ADCY1*, *ATAD3B* (семейство АТРаз, ААА-домен, содержащий 3В) и *CAP1*, которое ассоциировалось со стадией опухолевого процесса [96]. Таким образом, функциональная связь CAP с аденилатциклазой у более сложных организмов требует дополнительного подтверждения.

В клетках человека обнаружено две изоформы данного белка, одна из которых представлена практически во всех тканях человека (CAP1), а другая (CAP2) – более специфична и представлена в клетках мозга, сердца и скелетной мускулатуры [125; 156, 188]. CAP1 протеин состоит из шести доменов: N-суперспирализованного терминального домена, двух пролин-обогащенных регионов, WH2(Wasp homology 2)-мотива и высококонсервативного C-терминального домена [181]. N-концевой домен в клетке человека ассоциирован с кофилином [194] – актин-связывающим белком, который играет важную роль в деполимеризации актина двумя механизмами: с помощью разрезания самой актиновой нити или помогая диссоциации мономеров актина с заостренного конца, таким образом, увеличивая скорость деполимеризации актина. Таким

образом, CAP1 ускоряет обусловленную кофилином разборку актиновых филаментов.

Также, С-концом и WH2-доменом CAP1 белок может самостоятельно с высоким сродством связываться с мономерами актина и разрывать его связи с белком твинфилином [117]. Так, два этих механизма могут позволять белку CAP1 ускорять реорганизацию F-актина в клетке, что необходимо для клеточной миграции, так как способствует формированию актин-богатых структур, таких как филоподии и ламеллоподии [193]. Показано, что истощение CAP1 в клетках, которые в нормальных условиях обладают подвижностью (фибробласты, эндотелиальные клетки и др.), приводит к ее снижению [188].

Избыточная экспрессия CAP1 и кофилина стимулирует инвазию и метастазирование в опухолевых клетках [78], что может быть ассоциировано с агрессивным течением и низкой выживаемостью при раке легкого. Так, в исследованиях показано, что значения белка CAP1 возрастают в ткани немелкоклеточного рака легкого по сравнению с неопухолевой тканью, а экспрессия CAP1 в метастазирующих опухолях значительно превышает таковую в ткани неметастазирующих опухолей, отмечена взаимосвязь экспрессии белка CAP1 со стадией аденокарциномы легкого [157]. Повышение экспрессии CAP1 в опухоли и сыворотке крови и его достоверная корреляция с наличием лимфогенных метастазов отмечена и в опухолях других локализаций: при раке поджелудочной железы, молочной железы, раке яичников, плоскоклеточном раке пищевода, плоскоклеточной карциноме головы и шеи [11; 78; 110; 113; 184].

Кроме важной роли CAP1 в реорганизации цитоскелета, показано его участие в других внутриклеточных процессах. Так, CAP1 регулирует запуск митохондриально-зависимого пути апоптоза: при воздействии проапоптотических агентов на клетку наблюдается их перемещение к митохондриям и стимуляция апоптоза. Транслокация этого белка явилась проапоптотическим событием, что подтверждалось тем, что CAP1-нокдаун клетки были устойчивы к индукции апоптоза [173]. Показана роль CAP1 в процессах эндоцитоза: истощение CAP1 снижало эффективность поглощения трансферрина клетками NIH3T3. Кроме

того, CAP1 регулирует процесс клеточной миграции: истощение CAP1 в клетках V16F1 уменьшало их подвижность [43]. Ингибирование CAP1 *in vitro* приводит к увеличению размера клетки, хорошо развитым ламеллоподиям, накоплению фибриллярного актина (F-actin), к изменениям в фосфорилировании кофилина, активации киназы фокальных контактов (ФАК) и усилению клеточной диссеминации [188]. На клетках HeLa показано, что увеличение клеточной подвижности связано с тем, что CAP1-нокдаун активирует сигнальный путь клеточной адгезии путем «inside-out signaling», или сигналов, возникающих внутриклеточно, но направленных в межклеточный матрикс [193].

Напарник CAP1 – кофилин, также относится к группе филамент-деполимеризующих белков. Он может деполимезировать «-»-конец актиновой нити, тем самым предупреждая их сборку, а также разрывать актиновые нити на большие фрагменты [84]. Для эффективного функционирования кофилина требуются свободные от тропомиозина «старые» нити актина, в составе которых он связан с АДФ/АДФ+Ф, и надлежащий уровень рН. При наличии доступного АТФ-G-актина кофилин ускоряет полимеризацию актина, предоставляя свободные концы для полимеризации и способствуя активации Arp2/3 комплекса [45]. Имеются данные об изменении экспрессии кофилина при различных типах опухолей как в сторону повышения, так и в сторону понижения [102].

Таким образом, многочисленные данные подтверждают важную роль ассоциированных с клеточной подвижностью белков в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей, но возможные пути регуляции экспрессии этих белков и механизмов их работы в опухолевых клетках *in vivo* остаются изученными не в полной мере.

1.3.2 Роль белков клеточной подвижности в патогенезе немелкоклеточного рака лёгкого

В патогенезе НМРЛ белки клеточной подвижности также могут играть важную роль, как и при раках других локализаций, но представленные в

литературе данные немногочисленны. Имеются данные о связи изменения экспрессии фасцина со стадией рака легкого [189]. Также показана его значимость в канцерогенезе при НМРЛ и оценена возможность использования фасцина как опухолевого маркера [192]. Представлены единичные данные об участии актин-связывающих белков гельзолина, CapG и профилина в прогрессии НМРЛ [160; 195].

SAR1 относится к одним из малоизученных актин-связывающих белков. За последние 10 лет было показано участие SAR1 в патогенезе рака нескольких локализаций, в том числе и рака легкого. С помощью методов ПЦР в реальном времени, вестерн блоттинг на клеточных линиях неинвазивного (95-C) и инвазивного (95-D) рака легкого, было показано, что значения белка SAR1 возрастают в ткани рака легкого по сравнению с неизменной тканью, а экспрессия гена SAR1 в ткани метастазирующих опухолей значительно превышает таковую в ткани не метастазирующих опухолей. В этой же работе отмечена взаимосвязь экспрессии гена SAR1 со стадией аденокарциномы легкого [157]. Другими исследователями на тканях НМРЛ, взятых у больных на разных стадиях заболевания, методами иммуногистохимии и Вестерн-блоттинга была построена модель с использованием SAR1 для предсказания появления метастазов в головном мозге с чувствительностью и специфичностью 79.5 и 67.1 %, соответственно. Авторы предположили, что SAR1 включен в патогенез возникновения метастазов в головной мозг, и что высокие уровни этого белка могут предсказывать неблагоприятный прогноз для пациентов с немелкоклеточным раком легкого [178].

Также показано, что важную роль в метастазировании рака легкого играет кофилин. Многочисленные исследования на клеточных линиях НМРЛ показывают, что ингибирование кофилина тормозит миграцию и инвазию опухолевых клеток [34; 91; 159]. Кроме того, протеомным анализом была показана возможная значимость кофилина, как гена множественной лекарственной устойчивости и радиорезистентности в клетках аденокарциномы

легкого [40; 176]. Некоторые исследователи предлагают использовать кофилин как диагностический и прогностический биомаркер при НМРЛ [48; 122; 126].

В литературе также имеются данные о вовлеченности белка межклеточной адгезии β -катенина в патогенез рака легкого. Иммуногистохимически у пациентов НМРЛ была показана гиперэкспрессия компонентов Wnt-сигнального пути, что ассоциировалось с опухолевым ростом и с неблагоприятным прогнозом [80]. Сигнальный путь, активирующийся β -катенином, оказывает стимулирующее влияние на рост и инвазию немелкоклеточного рака легкого, как и на опухоли других локализаций [79]. Кроме того, в экспериментах на мышах было показано, что при раке легкого β -катенин регулирует появление метастазов в кости [185].

Таким образом, многочисленные литературные данные подтверждают вовлеченность белков клеточной подвижности в патогенез рака легкого. Тем не менее, CAP1 является одним из малоизученных актин-связывающих белков при опухолевой прогрессии в общем и при НМРЛ в частности. Также в настоящее время не достаточно изучена возможная регуляция данных белков при метастазировании рака легкого.

1.4 Система контроля качества клеточного протеома

Канцерогенез и последующая опухолевая прогрессия возможны при эффективной регуляции количества и функций многих белков, обеспечивающих эти процессы. Для сохранности клеточного протеома, нормального функционирования клеток и регуляции их биологического ответа существует система контроля качества белков, включающая молекулярные шапероны и энергозависимые протеазы, представленные, главным образом, протеасомами и кальпаинами [18; 21]. Считается, что протеазы и шапероны взаимодействуют друг с другом и образуют сеть, которая представлена ферментами различных каталитических типов и обеспечивает эффективный протеолиз в норме и при патологии [18; 21; 136].

1.4.1 Характеристика убиквитин-протеасомной системы и ее участие в развитии злокачественных новообразований

Протеасомы представляют собой мультисубъединичный мультиферментный комплекс. Они составляют около 1% всего клеточного белка, определяют время жизни и активность многих важных белков в клетке. Протеасомы разрушают регуляторные белки, осуществляют протеолиз цитозольных, ядерных белков, превращают неактивные белки-предшественники в активные, участвуют в презентации комплекса гистосовместимости I типа, регулируют транскрипцию генов [100; 170].

Каталитические комплексы протеасомной системы представлены двумя пулами: 20S- и 26S-протеасомы. Они отличаются строением, молекулярной массой и коэффициентом седиментации (его выражают в единицах Сведберга и обозначают буквой S при числе). 26S протеасома включает в себя каталитическое бочкообразное ядро (20S протеасому), к которому с одной или с двух сторон присоединены регуляторные частицы. Если по крайней мере одной из этих частиц является PA700 (19S регуляторная частица), то образуется 26S протеасома, осуществляющая, главным образом, АТФ- и убиквитин-зависимый протеолиз большинства клеточных белков. Если же в роли регуляторной частицы выступает другой белок (РА28, РА200), то такая ассоциация представляет собой активированную 20S протеасому [4].

20S протеасома представляет собой полый цилиндр, образованный четырьмя лежащими друг на друге кольцами. Каждое из них состоит из семи белковых субъединиц, причем периферические кольца сформированы субъединицами а-типа, а два центральных – b-типа. Канал внутри цилиндра, расширяясь, образует три камеры: большую центральную и две меньшие, по краям. В центральной камере и осуществляется протеолиз. Субъединицы а-кольца за счет своих гидрофобных участков закрывают отверстие в центральный канал и препятствуют случайному проникновению белков в протеолитическую камеру. Кроме того, эти же субъединицы отвечают за присоединение других

высокомолекулярных комплексов, которые регулируют работу 20S протеасомы [88].

Субъединицы β -кольца обладают трипсинподобной, химотрипсинподобной и каспазаподобной активностями [27]. Каспазаподобную активность демонстрирует β 1-субъединица протеасом (гидролиз пептидной связи после отрицательно заряженных аминокислот); β 2-субъединица отвечает за трипсиноподобную активность (гидролиз после положительно заряженных аминокислот); β 5-субъединица осуществляет химотрипсинподобную активность (гидролиз после нейтральных аминокислот) [4]. Каспазаподобная активность протеасом изначально называлась пептидил-глутамат дегидрогеназная, но в 1999 году Киселевым А. было показано, что данная активность протеасом в 30 раз быстрее режет белки после аспартата, чем после глутамата, чем напоминала в своей специфичности каспазы, и в связи с этим получила название каспазаподобная [98].

При определенных условиях протеолитические субъединицы β 1, β 2, β 5 конститутивных 20S протеасом могут заменяться на иммунные (индуцибельные) LMP2, MECL1 и LMP7, соответственно. Замена конститутивных субъединиц на иммунные приводит к изменению их специфичности, вследствие чего они продуцируют иммуногенные пептиды для их презентации главным комплексом гистосовместимости I класса [59]. В настоящее время активно изучаются неиммунные функции иммунных протеасом, в частности выясняется их роль в онкогенезе.

В формировании 20S протеасомы принимает участие активатор PA28, состоящий из нескольких субъединиц, в его присутствии протеасома расщепляет только короткие полипептиды. Формирование же 26S протеасомы осуществляется путем присоединения 19S регуляторной частицы (PA700) к коровой 20S субъединице. 26S протеасома участвует в деградации основной массы клеточных белков [151]. 19S-регуляторная частица состоит из 17 коровых субъединиц. Шесть субъединиц являются АТФазами. Эти субъединицы регуляторной частицы являются гомологичными и обозначаются как Rpt

(Regulatory particle tripleA-ATPase). Остальные субъединицы обозначаются как Rpn (Regulatory particle non-ATPase). Rpt-субъединицы необходимы для связывания, разворачивания и удержания субстрата [4].

Как будут распределены разные формы и в каком количестве понадобятся клетке, зависит от ее молекулярных потребностей в определенное время ее жизни и в конкретных обстоятельствах [100]. Помимо классического убиквитин- и АТФ-зависимого протеолиза протеасомы осуществляют убиквитин-независимую, АТФ-независимую деградацию, разрушение пептидов 20S частицей, и неполный протеолиз [4; 88]. Причем таким «неклассическим» образом разрушаются многие белки, регулирующие основные клеточные процессы в норме и при патологии.

Возникновение и развитие злокачественных новообразований связано с активацией пролиферации [72], ингибированием процесса апоптоза, нарушением клеточного цикла, а также стимуляции выработки факторов роста [140], что в свою очередь связано с функционированием протеасомной системы [142], поскольку эффективная регуляция количества и функции многих белков, зависит и от процессов, связанных с их деградацией. Протеасомная система принимает участие в разрушении многих регуляторных белков, в том числе молекул путей передачи сигналов от ростовых факторов и, частично, самих рецепторов ростовых факторов, осуществляет протеолиз белков, превращает неактивные белки-предшественники в активные, участвует в презентации комплекса гистосовместимости I типа, регулирует транскрипцию генов.

Значимым для канцерогенеза процессом, в регуляции которого принимает участие убиквитин-протеасомная система, является апоптоз. Многие ядерные белки, опосредующие программируемую клеточную гибель, являются субстратами для протеасом: транскрипционные факторы (c-Fos, c-Myc, AP-1), опухолевый супрессор p53, ингибитор NF- κ B, белки клеточного цикла, белки семейства Bcl-2, белки, контролирующие активность каспаз (IAPs) и участвующие в проведении проапоптотического сигнала (cFLIP) [27]. Регуляторные белки могут выступать в роли либо проапоптогенных белков или же, наоборот, антиапоптогенных. Пример подобных превращений – белок p53, уровнем

которого поддерживается в здоровой клетке соотношение между процессами роста и апоптоза. В результате присоединения к p53 убиквитиновой цепочки, данный белок становится субстратом для протеасомной деградации. При его ускоренном разрушении клетка идет по пути злокачественного перерождения [4; 88].

Продемонстрирована важная роль убиквитин-протеасомной системы в развитии опухолей различных локализаций, таких как плоскоклеточный рак головы и шеи, рак щитовидной железы, рак молочной железы, рак эндометрия, рак почки, рак кишечника [8; 13; 14; 15; 24; 28; 88]. Показано, что дисбаланс в функционировании протеасомной системы способствует формированию опухолевой прогрессии в отдаленные сроки при опухолях [23].

Таким образом, относительное содержание протеасом в клетке, их состав и активность изменяются в соответствии с потребностями клетки и условиями, в которых она находится, что становится возможным благодаря взаимодействию протеасом с большим количеством белков, а также благодаря механизмам регуляции на уровне транскрипции, которые на данный момент остаются мало изученными. Роль убиквитин-протеасомной системы в инвазии и метастазировании НМРЛ может быть обусловлена участием в деградации многих регуляторов и эффекторов этих процессов.

1.4.2 Характеристика кальпаиновой системы и ее участие в развитии злокачественных новообразований

Менее изученной протеолитической системой является кальпаиновая. Кальпаины – кальций-зависимые протеиназы, ответственные за селективную деградацию белков в цитозоле клеток. Кальпаиновая система представлена Ca^{2+} -зависимыми пептидазами. Осуществляемый кальпаинами протеолиз, в отличие от протеасомного, является частичным, в ходе которого не происходит полной деградации белка, а лишь изменяется его структура. Таким образом, кальпаины - это протеазы-«модуляторы» [150].

Физиологические субстраты, расщепляемые кальпаинами, можно разделить на две группы: белки, ответственные за передачу сигналов, и белки цитоскелета. К первой группе белков относят родопсин, протеинкиназу А и протеинкиназу С. Миофибриллярные белки (актин, миозин, парамиозин, тропомиозин, тропонины Т и I) и актин-связывающие белки принадлежат ко второй группе [155].

В настоящее время выделяют 15 кальпаинов, но наиболее изученные в этой системе являются μ - и m -кальпаины. Также в эту протеолитическую систему входит кальпастатин – белок-регулятор кальпаиновой системы. Этот ингибитор специфически угнетает протеолитическую активность μ - и m -кальпаинов [73]. В нативной форме $\mu(1)$ - и $m(2)$ -кальпаины имеют гетеродимерную структуру. Их каталитические субъединицы – продукты разных генов (*CAPN1* и *CAPN2*), тогда как регуляторная субъединица (*CPNS1*) едина для обеих форм [116].

Каталитическая субъединица кальпаина подразделяется на четыре домена [133]. Каталитический домен II содержит аминокислотные остатки Cys105, His262 и Asn286, которые формируют типичную каталитическую триаду цистеиновых протеиназ [68]. Домен III обеспечивает сопряжение каталитического домена II и Ca^{2+} -связывающего домена IV и усиление Ca^{2+} -индуцированных конформационных изменений, а также ассоциацию кальпаинов с фосфолипидами мембран [164].

Помимо «повсеместных» существуют тканеспецифичные кальпаины, мРНК которых обнаруживается, главным образом, в клетках скелетных (кальпаин 3a) или гладких мышц (кальпаин 8), в пищеварительном тракте (кальпаин 9), в яичках (кальпаин 11) [155]. Кальпаины являются единственным субстратом для кальпастатина, высокоспецифичного их ингибитора. Кальпастатин связывается с определенными доменами кальпаина: со II, содержащим триаду цистеинового типа (Cys105, His262, Asn286), IV и VI – кальций связывающими доменами [150].

Взаимодействие кальпаиновой и протеасомной систем друг с другом представляется неоднозначным, но согласованным клеткой. Не исключено, что одним из механизмов взаиморегуляции этих двух систем в соответствии с

нуждами клетки может являться процессинг кальпаинами регуляторных субъединиц протеасом. Так, в нейронах при активации кальпаинов наблюдался процессинг Rpn10 субъединицы 26S протеасомы, сопровождаемый повышением уровня и активности 20S протеасом [81]. Другим механизмом взаимосвязи между этими двумя протеолитическими системами может выступать предварительный процессинг кальпаинами субстратов, которые впоследствии направляются для деградации по протеасом-зависимому пути, и их подготовка и «активация» для последующей утилизации протеасомами [148]. Интересно, что в клеточных линиях рака легкого бортезомиб, подавляя активность протеасом, вызывал кальпаин-зависимую деградацию ингибитора NF-κB (IκB) [108].

Таким образом, кальпаины, являющиеся важными протеазами-модуляторами, осуществляют частичный протеолиз в клетке и часто поставляют субстрат для дальнейшей деградации белка протеасомами.

Многочисленные исследования подтверждают участие кальпаиновой системы в опухолевом росте, но роль их в канцерогенезе во многом остается неясной [132; 152]. Показано, что в тканях опухолей многих локализаций, таких как рак молочной железы, рак почки, колоректальный рак, рак желудка, рак эндометрия наблюдается увеличение экспрессии кальпаинов [14; 24; 101]. Для рака почки, рака яичника и рака желудка показано, что присутствие метастазов сопровождается увеличением кальпаиновой активности [8; 24].

Осуществляемый кальпаинами лимитированный протеолиз про- и антиапоптотических белков может активировать или, напротив, инактивировать такие белки, как p53, Bcl-2, Bcl-x1, Bid, Bax, каспазы-3, -7, -8, -9 и -12, NF-κB [158]. Так же как и протеасомы, кальпаины принимают участие в регуляции ангиогенеза. Показано, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ключевой ангиогенный цитокин, повышает экспрессию и активность кальпаинов, а их ингибирование подавляет образование новых кровеносных сосудов, что указывает на роль кальпаинов в реализации эффектов VEGF [154; 132].

Кальпаины принимают участие и в контроле клеточного цикла. Так, одним из субстратов для этих протеиназ является p27Kip1, важный негативный

регулятор клеточного цикла [56; 75]. Также показано, что кальпаины разрушают циклин E, играющий ключевую роль в переходе клетки из G1 в S-фазу [76]. Необходимо отметить, что существует много точек приложения для протеолитической регуляции кальпайнами клеточного цикла, в связи с чем кальпаины могут быть как позитивными, так и негативными его регуляторами. Предполагается, что влияя на активность кальпайнов, можно воздействовать на прохождение клеткой клеточного цикла, способствуя гибели опухолевых клеток [107].

Таким образом, кальпайновая система играет важную роль в развитии рака. Тем не менее, многие вопросы, касающиеся поведения кальпайнов в злокачественных клетках остаются неясными, в связи с чем изучение состояния этих протеиназ при раке молочной железы представляет большой интерес.

1.4.3 Характеристика малого белка теплового шока HspB5 и его участие в развитии злокачественных новообразований

Класс шаперонов в клеточной системе контроля качества белков делится на конститутивные белки, синтез которых не зависит от стрессовых воздействий на клетки, и индуцибельные или белки теплового шока – БТШ (the heat shock proteins – Hsp), синтез которых резко увеличивается при стрессовых воздействиях, таких как изменения условий окружающей среды, метаболические или физиологические изменения [18; 37].

Все белки теплового шока имеют доменную организацию, а важным их свойством является способность образовывать крупные олигомерные комплексы с молекулярной массой от 100 до 5000 кДа в условиях стресса, в то время как их собственный размер составляет до 100 кДа, и предотвращать агрегацию частично денатурированных белков в клетке. [18; 37]. Помимо агрегации неправильно свернутых или частично развернутых белков, основными биологическими функциями белков теплового шока являются коррекция структуры и конформации других белков, повторная сборка денатурированных белков,

разворачивание нативных белковых субстратов для транслокации их через мембраны, а также белковых мономеров для их последующей деградации [18].

По молекулярной массе белки теплового шока разделяют на большие и малые. Группа больших БТШ наиболее изучена. Представители этого семейства значительно различаются по структуре, но все обладают АТФ-азной активностью, которая важна для увеличения сродства и скорости связывания белков-мишеней. [18]. Малые БТШ (мБТШ), Hsp В 1-11 не обладают АТФ-азной активностью и содержат в своем составе консервативный С-концевой домен [90].

Малые БТШ, выполняя свои шаперонные функции, участвуют в стабилизации белков цитоскелета, вовлечены в клеточный цикл, апоптоз, ангиогенез, а также транспортировку рецепторов на мембрану клетки, что представляется интересным при изучении злокачественных новообразований. Циркулирующие мБТШ принимают участие в стресс-сигналинге, ангиогенезе, клеточной миграции и регуляции иммунной системы [37].

HspB5 (α В-кристаллин) относится к малым белкам теплового шока и по своим функциям является истинным БТШ, то есть обладает не только шаперонными функциями, но и его содержание повышается в ответ на гипертермию и другие стрессовые реакции, а также играет важную роль в клетке для выживания в условиях стресса [35; 161]. α В-кристаллин впервые был обнаружен в хрусталике глаза, откуда получил свое название и экспрессируется во всех тканях человека [161]. HspB5 состоит из консервативного для всех малых БТШ С-концевого домена, α -кристаллина и N-концевого домена, содержащего WDPF-мотив [35].

Фосфорилирование протеинкиназами HspB5, особенно в условиях стресса, позволяет ему участвовать в апоптозе, клеточном цикле и дифференцировке: он деградирует циклин D, который играет важную роль в G1/S-переходе клеточного цикла и повышенно экспрессируется в раковых клетках [37; 77]. Также HspB5 предотвращает TNF α -стимулированный апоптоз [32], а при взаимодействии с проапоптотическими молекулами в клетке, такими как Bax и Bcl-Xs ингибирует их передвижение к митохондриям. HspB5 может взаимодействовать с

некоторыми каспазами, например связывать про-каспазу-3 [37]. HspB5 увеличивает количество глутатиона в клетке, чем косвенно способствует предотвращению клеточной смерти, вызванной оксидативным стрессом [86]. Таким образом, антиапоптотическое и цитопротективное действие HspB5 может быть использовано раковыми клетками для выживания.

Способность HspB5 влиять на подвижность опухолевых клеток является свидетельством его участия в метастазировании. HspB5 стабилизирует промежуточные филаменты и F-актин; является шапероном для таких актин-связывающих белков, как тубулин, десмин и кофилин [37]. На клеточной культуре пигментного эпителия сетчатки было показано, что HspB5 связывает VEGF-A и участвует в фолдинге и секреции данной молекулы, а следовательно ассоциирован с опухолевым неоангиогенезом и возникновением метастазов [92]. Также в исследованиях было показано, что снижение экспрессии HspB5 в карциномах головы и шеи приводит к снижению как секреции сигнального белка VEGF, так и снижению клеточной подвижности. [169].

Повышенная экспрессия HspB5 ассоциирована с резистентностью опухоли к химиотерапии при раке молочной железы [37]. Во время гипертермии HspB5 и другие истинные белки теплового шока могут взаимодействовать с развернутыми протеинами в районе их гидрофобных участков и препятствовать дальнейшей агрегации белков [175]. Дальнейшая судьба протеинов, окруженных белками теплового шока, может быть либо их реактивация, либо деградация убиквитин-протеасомной протеолитической системой клетки [37]. HspB5 является частью комплекса, участвующего в полиубиквитинизации молекулы, которая является своеобразной меткой для дальнейшей деградации белка 26S протеасомой [86]. Кроме того, белки теплового шока могут помогать 20S протеасоме деградировать меченые белки в отсутствие 19S регуляторного комплекса или системы убиквитинирования [161].

1.4.4 Участие белков системы контроля качества клеточного протеома в патогенезе немелкоклеточного рака лёгкого

При НМРЛ, как и при любом патологическом процессе, белки системы контроля качества клеточного протеома играют важную роль, т.к. осуществляют регуляцию ключевых процессов в клетке: проведение внутриклеточных сигналов, экспрессию рецепторов, ростовых и транскрипционных факторов, пролиферативную активность, апоптоз.

На клеточной культуре НМРЛ подтверждено участие 26S протеасомы в деградации Bax и Bim белков при регуляции апоптоза [65]. Методами сравнительной геномной гибридизации и микрочиповыми исследованиями показана важная роль субъединицы каталитического ядра протеасомы в регуляции клеточного цикла клеток рака легкого [89]. Следует сказать, что большинство работ по изучению протеасом при раке легкого касаются их ингибитора, который исследуется как противоопухолевый препарат [50; 53].

При терапии цисплатином отмечают активацию кальпаинов в реализации программируемой клеточной гибели клеток НМРЛ [112]. Также показано, что кальпаины принимают участие в активации рецептора EGFR, важного участника патогенеза НМРЛ [95]. Показана прогностическая значимость экспрессии малой субъединицы кальпаинов Capn4 для немелкоклеточного рака легкого. Благодаря этой субъединице кальпаины могут усиливать работу матриксной металлопротеиназы 2 [71]. Матриксные металлопротеиназы – внеклеточные цинк-зависимые эндопептидазы, которые обеспечивают деградацию экстраклеточного матрикса, облегчая опухолевую инвазию и метастазирование [183].

Относительно HspB5 существуют противоречивые данные о его значимости при НМРЛ. Так, некоторыми исследователями показана его прогностическая значимость больных НМРЛ [51; 131]. В то же время, другие авторы показали его недостаточно чувствительным и специфическим маркером прогрессии, т.к. его экспрессия зависит от многих посторонних факторов при НМРЛ [46]. Представляется вероятным, что HspB5 воздействует по-разному на различных

этапах опухолевого роста, и его экспрессия будет зависеть от различных молекулярных характеристик конкретных опухолевых клеток.

Таким образом, система контроля качества клеточного протеома, а именно протеасомы, кальпаины и HspB5, могут служить важным фактором канцерогенеза и опухолевой прогрессии при НМРЛ. Но, тем не менее, данные системы изучаются обособленно и проводятся на клеточных линиях или животных, что не всегда позволяет правильно экстраполировать данные на опухоли человека. Также недостаточно данных для однозначного ответа на вопрос о влиянии протеасом, кальпаинов и HspB5 на процессы регуляции миграции злокачественных клеток.

1.5 Регуляция белков клеточной подвижности системой контроля качества клеточного протеома

Процессы инвазии и метастазирования определяются совокупностью многих изменений, среди которых важное значение имеет нарушение адгезивных взаимодействий и приобретение клетками способности к передвижению [141]. Миграция клеток, являясь с одной стороны нормальным физиологическим процессом для целого ряда клеток, также является важным компонентом опухолевой прогрессии. Несмотря на то, что патологическая подвижность опухолевых клеток обеспечивает инвазивный рост, рецидивирование, ангиогенез и формирование отдаленных метастазов, не до конца определен вопрос регуляции белков клеточной адгезии и актин-связывающих белков при опухолевых заболеваниях.

На некоторых типах клеток показана возможность деградации протеасомами белков актинового цитоскелета, в том числе актин-связывающих белков, таких как филамины, гельзолин и кофилин [74; 124; 186]. Функционирование β -катенина жестко регулируется путем различных посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование Ser/Thr и Tyr, убиквитилирование и ацетилирование [179]. Некоторые авторы предполагают,

что убиквитин-протеасомная система может осуществлять утилизацию отработавшего β -катенина [134; 191], а также посттрансляционные модификации этого белка во время его участия в Wnt-сигнальном пути [174].

Существуют данные об активном участии кальпаинов в деградации белков цитоскелета, играющих важную роль в процессе метастазирования [106]. На клеточных культурах показано повышение активности кальпаинов при трансформации клеток, что приводит к нарушениям межклеточной адгезии, перестройке актинового цитоскелета, морфологической трансформации и клеточной миграции [47]. Кальпаины могут быть вовлечены в регуляцию процессов инвазии и метастазирования злокачественных опухолей, так как субстратами для кальпаиновой системы являются белки цитоскелета клетки [67]. Так субстратами для кальпаинов являются β -катенин, гельзолин, филамин, анкирин, N-кадгерин, десмин, β -спектрин, талин, тропонины, тубулин, виментин и другие [106]. В тоже время, ингибирование кальпаин-зависимого протеолиза этих белков может двояко сказаться на развитии опухолевого процесса: с одной стороны тормозить перестройку актинового цитоскелета и формирование филоподий и ламеллоподий [147], а с другой стороны – приводить к миграции и развитию региональных метастазов [54; 132]. По всей видимости, выбор направления развития опухолевого процесса зависит от взаимодействия кальпаинов с белками клеточной подвижности и адгезии, которые экспрессируются клеткой. β -катенин также может являться субстратом для кальпаинов. В результате лимитированного протеолиза β -катенина, осуществляемого кальпаинами, образуется стабильный фрагмент с молекулярной массой 75 кДа, который, по мнению одних авторов, накапливается в ядре и цитоплазме и приводит к активации TCF-зависимой транскрипции генов [31], но, по мнению других, напротив, предотвращает её и в опухолях, где наблюдаются мутации в гене β -катенина или APC, препятствующие его деградации протеасомами, служит альтернативным путем снижения содержания и регуляции активности β -катенина [42]. В виду противоречивости данных вопрос о значении

кальпаин-зависимого протеолиза β -катенина для клетки и его роли в опухолевой прогрессии на сегодняшний день остается открытым.

Шапероны также способны влиять на подвижность опухолевых клеток, участвуя в фолдинге/рефолдинге белков. HspB5 стабилизирует промежуточные филаменты и F-актин; является шапероном для таких актин-связывающих белков, как тубулин, десмин и кофилин [37]. Малый БТШ HspB5 может проявлять шаперонную функцию и в отношении β -катенина: он подавляет прогрессирование плоскоклеточной карциномы носоглотки, стабилизируя кадгерин/катениновые адгезивные контакты и модулируя функцию β -катенина [82].

Вероятно, для развития метастазов является необходимым наработка достаточного количества определенных протеаз и белков-шаперонов в раковых клетках, регулирующих этот процесс.

Подобная работа системы контроля качества клеточного протеома в отношении белков клеточной подвижности возможна и при раке легкого, что требует изучения для понимания фундаментальных механизмов онкогенеза и разработки маркеров метастазирования и прогностических критериев при НМРЛ.

Заключение по обзору литературы

Рак легкого является одной из часто встречающихся злокачественных опухолей и наиболее распространённой причиной смерти от онкологической патологии. Несмотря на разнообразие существующих методов диагностики, к моменту установления диагноза практически у половины больных уже выявляются метастазы. Подавляющее большинство пациентов при первичном обращении уже имеют метастазы в регионарные лимфоузлы.. Среди гистологических вариантов злокачественных опухолей легкого наиболее часто встречается немелкоклеточный рак.

Лечение больных НМРЛ по-прежнему остается предметом исследований и дискуссий. Основным и единственно радикальным методом лечения является хирургический, однако 5-летняя выживаемость на протяжении последних десятилетий не претерпела существенных изменений и находилась в прямой

зависимости от стадии заболевания и гистологической структуры опухоли. В связи с этим в настоящее время активно развиваются методы комбинированного лечения НМРЛ, включающие рациональное сочетание радикального хирургического вмешательства с лучевой и/или лекарственной противоопухолевой терапией. Выбор метода лечения, несомненно, влияет на особенности течения и прогноз заболевания, во многом определяя вероятность опухолевой прогрессии.

Основными характеристиками опухолевой прогрессии являются инвазивный рост и метастазирование. Необходимо изучение данных процессов на молекулярном уровне как для понимания закономерностей изменения клеточных процессов при распространении опухолей, так и для разработки методов прогноза метастазирования и подбора тактики лечения.

Значимыми процессами, определяющими метастатический потенциал опухолевых клеток, являются нарушение адгезивных свойств и способность к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которых играет реорганизация актинового цитоскелета. В этой связи наиболее актуальным является изучение актин-связывающих белков, к числу которых относятся CAP1 и кофилин, а также белка, находящегося в комплексе с молекулами межклеточной адгезии - β -катенина. CAP1 осуществляет разборку нитей актина самостоятельно, а также в связи с белком кофилином, кроме того, имеются данные об его участии в клеточном сигналинге. β -катенин же, находясь в составе катенин-кадгериновых комплексов, участвует в формировании межклеточных контактов. При их нарушении β -катенин освобождается из связи с E-кадгерином, накапливается в цитозоле, а затем участвует в активации TCL/LEF транскрипционных факторов, что вызывает повышение пролиферативной и миграционной активности клеток. В настоящее время не достаточно изучена возможная регуляция данных белков при метастазировании НМРЛ.

Для сохранности клеточного протеома, нормального функционирования клеток и регуляции их биологического ответа в клетке существует система контроля качества белков, включающая белки-шапероны и внутриклеточные

протеазы. Эти системы взаимодействуют друг с другом и образуют сеть, обеспечивая полный или частичный протеолиз белков в норме и при патологии.

HspB5 (α B-кристаллин) является мало изученным малый белок теплового шока и обладает свойствами истинного шаперона. Он может стабилизировать или являться шапероном при сборке компонентов цитоскелета и, таким образом, влиять на пространственно-временную организацию клетки. Малые БТШ могут поставлять белки на дальнейшую деградацию в протеасомную систему в клетке: HspB5 является частью комплекса, участвующего в полиубиквитинировании молекулы, которая является своеобразной меткой для дальнейшей деградации белка 26S протеасомой. Также α B-кристаллин может помогать 20S протеасоме деградировать меченые белки в отсутствие 19S регуляторного комплекса или системы убиквитинирования. Внутриклеточные протеолитические системы, такие как убиквитин-протеасомная и кальпаиновая, самостоятельно участвуют в деградации белков актинового цитоскелета, в том числе актин-связывающих белков, таких как филамины, гельзолин и кофилин. Существуют данные и об активном участии протеасом и кальпаинов в деградации β -катенина. Для кальпаиновой системы белки цитоскелета клетки вообще являются физиологическими субстратами. Доказано, что процесс развития опухоли тесно связан с функционированием протеолитических систем. Шапероны и системы протеолиза участвуют в регуляции пролиферативной активности, дифференцировки, миграции, транскрипции генов, ингибировании апоптоза, стимуляции неоангиогенеза и функционировании иммунной системы. Все выше сказанное свидетельствует о том, что изучение роли белков CAP1, кофилина, β -катенина, участвующих в инвазии и миграции опухолевых клеток, их возможных регуляторов белка теплового шока α B-кристаллина, а также внутриклеточных протеасомной и кальпаиновой протеолитических систем позволило бы выявить новые молекулярные механизмы регуляции процессов адгезии и локомоции клеток НМРЛ, которые вносят значимый вклад в процесс метастазирования.

ГЛАВА 2. Материал и методы исследования

2.1 Клиническая характеристика больных

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 №2288), получено разрешение этического комитета института. В исследование было включено 60 пациентов с НМРЛ ($T_{2-3}N_{0-2}M_0$) в возрасте от 44 до 77 лет (средний возраст $58,9 \pm 1,1$ лет). Обследование пациентов до лечения включало: рентгенографию и компьютерную томографию органов грудной полости, фибробронхоскопию с гистологическим и цитологическим исследованием биопсийного материала, трансторакальную пункцию периферической опухоли, ультразвуковое исследование печени, надпочечников и сердца, ЭКГ, спирографию и общеклинические анализы, по показаниям МРТ головного мозга, сцинтиграфию скелета. Критериями исключения из исследования служили наличие тяжелой сопутствующей патологии, других диагностированных злокачественных новообразований.

Все больные были разделены на две клинические группы:

I группа: 40 больных НМРЛ, которым выполнялось радикальное хирургическое лечение (в объеме лобэктомии, билобэктомии или пневмонэктомии).

II группа: 20 больных НМРЛ, с термохимиолучевой терапией (ТХЛТ).

Методика термохимиолучевой терапии. При комбинированном лечении больным проводилось 2 курса предоперационной химиотерапии по схеме: паклитаксел 175 мг/м^2 в/в 1-й день, карбоплатин – расчет дозы по АУС 6 в/в 1-й день. Интервал между курсами химиотерапии и хирургическим лечением составлял 3 недели. Лучевая терапия в режиме классического фракционирования 2 Гр, 5 дней в неделю, СОД 40 Гр, локальная гипертермия на аппарате Celsius

TSC 2 сеанса в неделю, всего 8 сеансов. Температура > 420С, время сеанса 40-60 минут. Используемая частота: 13,56 МГц, мощность до 600Вт.

Эффективность ТХЛТ оценивалась по шкале RECIST 1.1. Полная регрессия – исчезновение всех очагов поражения на срок не менее 4 недель. Частичная регрессия – уменьшение измеряемых очагов на 30% или более. Прогрессирование – увеличение на 20% наименьшей суммы очагов поражения, зарегистрированной за время наблюдения, или появление новых очагов. Стабилизация – нет уменьшения, достаточного для оценки как частичного эффекта, или увеличения, которое можно оценивать как прогрессирование. Оценка объективного ответа проводилась по результатам рентгенологического исследования, спиральной компьютерной томографии и фибробронхоскопии. После операции удаленное легкое с опухолью и регионарными лимфатическими узлами подвергалось патоморфологическому исследованию. Исследовались фрагменты из центра опухоли, с периферии и на границе опухоли с окружающей тканью. Обязательному исследованию подвергалась линия резекции бронха.

Распределение больных НМРЛ по основным клинико-патологическим характеристикам в исследуемых группах представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-патологическая характеристика больных НМРЛ, включенных в исследование

Клинико-патологический параметр	Показатель	Число случаев (%)
Возраст	40–49 лет	8 (13,3)
	50–59 лет	18 (30,0)
	60–69 лет	30 (50,0)
	70-79 лет	4 (6,7)
Пол	Мужчины	47 (78,3)
	Женщины	13 (21,7)
Размер опухоли (Т)	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	36 (60,0)
	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	24 (40,0)
Лимфогенные метастазы (N)	T ₂₋₃ N ₀ M ₀	15 (25,0)
	T ₂₋₃ N ₁ M ₀	35 (58,3)
	T ₂₋₃ N ₂ M ₀	10 (16,7)
Гистологический тип опухоли	Плоскоклеточный	24 (40,0)
	Аденокарцинома	36 (60,0)

Наибольшее число больных было в возрасте от 50 до 69 лет, что соответствует статистическим данным о заболеваемости раком легкого. Соотношение заболевших мужчин и женщин в исследуемых группах составило 4:1. Окончательная стадия заболевания устанавливалась после операции в соответствии с международной классификацией TNM Classification of Malignant Tumours (7th Edition) [149]. Морфологическое строение опухоли определяли в соответствии с классификацией рака легкого ВОЗ (2004). Плоскоклеточный рак был подтвержден в 40,0% случаев, аденокарцинома в 60,0%.

Дизайн исследования схематично изображен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

2.2 Материал исследования

Материалом для исследования служили образцы тканей первичных опухолей, лимфогенных метастазов и гистологически неизменной ткани, взятой на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, а также ткань неизменных лимфоузлов, полученные при выполнении радикального оперативного вмешательства. Весь полученный материал имел гистологическую верификацию. Образцы тканей замораживали и хранили при -80°C .

2.3 Методы исследования

2.3.1 Получение осветленных гомогенатов

Для получения осветленных гомогенатов замороженные образцы ткани (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфере ($\text{pH}=7,5$), содержащем 2 мМ АТФ для определения активности протеасом и не содержащем АТФ – для активности кальпаинов, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 минут при 10000g и 4°C . Надосадочную жидкость (осветленный гомогенат) использовали для дальнейших исследований.

2.3.2 Определение активности протеасом и кальпаинов

Химотрипсиноподобную (ХПА) и каспазаподобную активность (КПА) протеасом определяли в осветленных гомогенатах опухолевых и неизменных тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC и Cbz-LLG-AMC, соответственно, который утилизируется химотрипсинподобными и каспазаподобными центрами протеасом [41]. Реакционная смесь для определения химотрипсинподобной и каспазаподобной активности протеасом содержала 20 мМ Tris-НСl ($\text{pH} 7,5$), 1 мМ дитиотрейтола, 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, 5 мМ MgCl_2

и 1 мМ АТФ. Реакцию проводили при 37°C в течение 20 мин. Определение активности кальпаинов (АК) проводили в осветленных гомогенатах по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC, такого же как и для ХПА протеасом. Реакционная смесь содержала 100 мМ Tris-HCl (pH 7,3), 145 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтола и 30 мкМ Suc-LLVY-AMC, с добавлением 10 мМ CaCl₂. Реакционная смесь с 30 мкМ ингибитора кальпаинов ALLN (N-ацетил-лейцин-лейцин-норлейцинал) не содержала CaCl₂ [138]. N-ацетил-лейцин-лейцин-норлейцинал ингибирует как кальпаины $K_i = 190$ (220) нМ, так и протеасомы $K_i = 6000$ нМ. Учитывая такую значительную разницу в константе ингибирования, можно считать, что этот ингибитор в высоких концентрациях (50–100 мкМ) ингибирует протеасомы, а в используемой концентрации 0.4 мкМ он ингибирует кальпаины [36]. Реакцию проводили в течение 30 мин при 20°C. Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре «Hitachi-850» (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. За единицу активности принимали количество фермента, при котором гидролизует 1 нмоль субстрата в течение 1 мин. Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, США) и ингибитор кальпаинов – MG101 (Sigma, США). Удельную активность протеасом и кальпаинов выражали в единицах активности на 1 мг белка (10^3 Ед/мг белка). Содержание белка определяли по методу Лоури [114].

2.3.3 Определение содержания субъединиц тотального пула протеасом, кофилина, фракций β -катенина

Содержание субъединиц тотального пула протеасом ($\alpha1\alpha2\alpha3\alpha5\alpha6\alpha7$), кофилина и фракций β -катенина (общий β -катенин и фосфо(Ser45)- β -катенин) оценивали с помощью метода Вестерн-блоттинг с применением первичных моноклональных антител к искомым белкам в разведении 1:1000 и вторичных анти-мышинных, анти-кроличьих антител (1:2000) (Cell Signaling Technology, США). За 100% был принят уровень изучаемых белков в неизменной ткани.

Проводилась стандартизация значений субъединичного состава на содержание β -актина (Cell Signaling Technology, США). Результаты выражали в процентах от содержания изучаемого белка в неизменной ткани.

Электрофоретическое разделение белков для последующего Вестерн-блоттинга проводили по Laemmli в 13% полиакриламидном геле. Пробы наносили в буфере, содержащем 0,0625М трис-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза осуществляли перенос полипептидов на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Для связывания антител и промывки мембран был использован полуавтоматизированный прибор iBind Western System (Thermo Fisher Scientific). Затем мембрану подвергали обработке системой хемилюминесцентной детекции ECL (GE Healthcare, Великобритания). Для иммунодетекции использовали гель-документирующую систему ChemiDoc Touch Imaging System (Bio Rad). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы «Image Lab». Стандартизация проводилась относительно β -актина. Результаты выражали в процентах от содержания субъединиц протеасом в неизменной ткани.

2.3.4 Определение уровня экспрессии мРНК кальпаинов 1 и 2, CAP1 и кофилина

РНК выделяли с использованием набора diaGene для выделения РНК из культур клеток (Qiagen, США) согласно стандартному протоколу. Раствор РНК хранили при температуре -80°C . Проверка качества РНК проводилась при помощи автоматического электрофореза на приборе 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc., США). Для этого использовался набор R6K ScreenTape (Agilent Technologies, Inc., США). Качество РНК оценивалось автоматически с помощью показателя RIN (от англ. RNA Integrity Number, показатель целостности РНК), варьирующего для исследуемых образцов РНК от 4 до 6 (рис.1). Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл.

Реакция обратной транскрипции проводилась при помощи специфичных праймеров к мРНК (CAPN1, CAPN2, CAP1, CFL1) в объеме 30 мкл с использованием готовой реакционной смеси «РеалБест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Реакция проводилась в течение 30 мин. при 42°C, затем проводили инактивацию обратной транскриптазы при 95°C в течении 2 мин. Полученная реакционная смесь, содержащая кДНК, в объеме 3 мкл сразу была использована в качестве матрицы для проведения количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве референсного гена использовался GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

Объем смеси для ПЦР имел конечный объём 25 мкл и содержал компоненты: БиоМастер HS-qPCR (100 mM Трис-НСl, pH 8,5, 100 mM КCl, 0,4 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,06 ед. акт./мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,025% Tween-20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы, SYBR Green 1 и инертный краситель) (Биолабмикс, Новосибирск) 12,5 мкл, 1 мкл прямого праймера, 1 мкл обратного праймера, 3 мкл кДНК матрицы и 7,5 мкл деионизованной воды. Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев при 95°C – 6 мин, 40 основных циклов: денатурация при 95°C – 10 сек, отжиг и элонгация: 52°C – 35 сек. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 (Thermo Fisher Scientific, США) и базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). Последовательность праймеров указана в таблице 2.

Расчет уровня экспрессии генов производили по методу, предложенному Pfaffl в 2001 году [127]. Для расчета использовали формулу (1):

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{t, \text{target}}(\text{calibrator-test})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t, \text{ref}}(\text{calibrator-test})}, \quad (1)$$

где E – эффективность реакции,

C_t – пороговый цикл генов-мишеней (target) и гена-рефери (ref),

ΔC_{t, target} (calibrator – test) – C_t гена мишени в калибраторе за вычетом C_t гена мишени в опытном образце,

ΔC_{t, ref} (calibrator – test) – C_t гена-рефери в калибраторе минус C_t гена-рефери в опытном образце.

Таблица 2 – Последовательность праймеров, используемых в количественной полимеразной цепной реакции.

Ген	Праймер F	Праймер R
CAPN1	5' AGAGCCTGGGTTACAAG 3'	5' TGTCGTTGAGAGTGAGG 3'
CAPN2	5' ATGCTAGATTCGGACGGGAG 3'	5' TGGAGTTGACAGGGGCATCTT 3'
CAP1	5' CCAAACGAGCCACAAAGAA 3'	5' ACCCATTACCTGAACTTTGACAT 3'
CFL1	5' CTGCCGCTATGCCCTCTA 3'	5' TTCTTCTTGATGGCGTCCTT 3'
GAPDH	5' GGAAGTCAGGTGGAGCGA 3'	5' GCAACAATATCCACTTTACCAGA 3'

Примечание – F (от англ. forward) – прямой праймер, R (от англ. reverse) – обратный праймер.

В качестве калибратора использовалась мРНК (кДНК), выделенная из морфологически неизменной ткани легкого.

2.3.5 Определение содержания белков CAP1 и HspB5

Содержание белков CAP1 и HspB5 определяли с помощью иммуноферментного метода (Cusabio, США; MyBioSource, США соответственно), согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов и стандартов измеряли на микропланшетном ридере Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны, указанной в инструкции производителя набора. Расчет концентрации определяемых белков осуществляли с помощью программного обеспечения Scanlt.

2.3.6 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов, проводилась с помощью программ IBM SPSS Statistics v.20.0. Для всех видов анализа статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$.

Проверка нормальности распределения исследуемых выборок проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, Краскала-Уоллиса с поправкой Бонферони для независимых выборок. Для оценки взаимосвязи признаков использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена, методы линейной и логистической регрессии. Прогностическая значимость признаков в отношении безметастатической и общей выживаемости у больных НМРЛ оценена с использованием обобщенного критерия Гехана-Вилкоксона. Кривые кумулятивной выживаемости строились по методу Каплана-Майера. Выживаемость больных определялась с помощью динамического (актуариального) метода. Расчет выживаемости проводился на второй год после окончания лечения с учетом выбывших из-под наблюдения больных и умерших от сопутствующих не онкологических заболеваний. Продолжительность жизни исчисляли с момента окончания лечения. Проверка специфичности и чувствительности показателей, показавших статистически значимый результат в отношении безметастатической и общей выживаемости, осуществлялась с помощью ROC-анализа. Результаты в таблицах представлены в виде $Me (Q1;Q3)$, где Me - медиана, $Q1$ и $Q3$ – нижний и верхний квартили.

ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение

3.1 Белки клеточной подвижности при немелкоклеточном раке легкого

Значимыми процессами, определяющими метастатический потенциал опухолевых клеток, являются нарушение адгезивных свойств [79] и способность к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которой играет реорганизация актинового цитоскелета [3]. Экспрессия актин-связывающих белков, к числу которых относятся циклаза-ассоциированный протеин (САР1) и кофилин в комплексе с молекулами межклеточной адгезии – β -катенина, при НМРЛ изучена недостаточно.

Провели определение содержания актин-связывающих белков (САР1 и кофилин), фракций β -катенина (общий β -катенин и фосфо(Ser45)- β -катенин) и экспрессии мРНК САР1 и кофилина у 60 больных НМРЛ (40 человек без ТХЛТ, 20 человек, которым перед оперативным вмешательством проводилась химио- и лучевая терапия). Изучаемые показатели оценивали в опухолевой и неизменной ткани, а также ткани метастатических и нормальных регионарных лимфоузлов; сопоставляли с основными клиничко-морфологическими параметрами (гистологический тип, стадия заболевания), а также оценивали влияние ТХЛТ на изменение показателей.

3.1.1 Актин-связывающие белки в опухолевой и неизменной ткани легкого

В результате проведенного исследования показано значимое увеличение содержания САР1 и кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов по сравнению с неизменной тканью легкого (таблица 3, рисунок 2).

САР1 и кофилин играют важную роль в процессе клеточного движения, как актиндеполимеризующие белки. Разрушая актиновые филаменты с одного конца, они способствуют активному тредмиллингу актина в клетках. Способность к движению является неотъемлемым свойством злокачественной клетки. Вероятно,

такие изменения актин-связывающих белков в опухолевом очаге могут свидетельствовать об активной инвазии опухолевых клеток, а также их подготовке к метастатическим процессам.

Таблица 3 – Содержание CAP1 в опухолевой, неизменной и метастатической ткани у больных немелкоклеточным раком легкого

Показатель	Неизменная ткань	Первичная опухоль	Лимфогенные метастазы	p
	n=40	n=40	n=31	
CAP1 (пг/мл)	671,00 (587,00; 711,00)	834,00 (714,00; 859,00)	775,00 (725,00; 844,00)	$p_{12}=0,007$; $p_{13}=0,034$; $p_{23}=0,601$

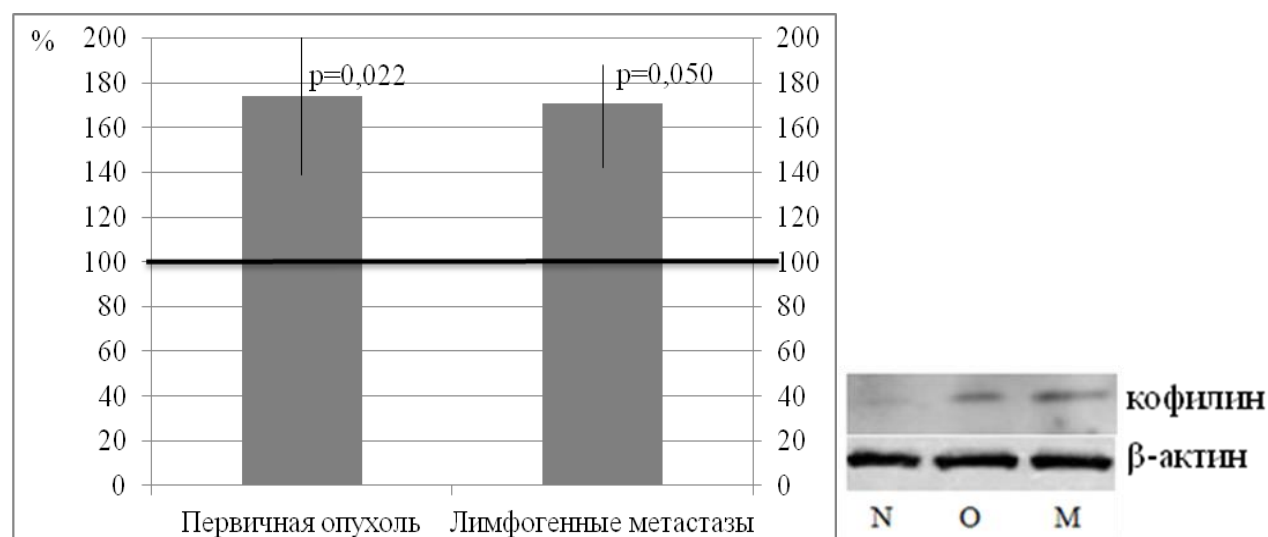


Рисунок 2 – Содержание кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов

Примечание – за 100% принято содержание белка в неизменной ткани; N – неизменная ткань легкого, O – ткань первичной опухоли, M – ткань лимфогенных метастазов.

В общем, наблюдается повышение уровня актин-связывающих белков в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов по сравнению с неизменной тканью, что свидетельствует о важности белков в опухолевой трансформации.

3.1.2 Изменение актин-связывающих белков в зависимости от гистологического типа опухоли, распространенности опухолевого процесса

Изучая содержание и экспрессию мРНК CAP1 и кофилина в зависимости от гистологического типа опухоли, различия в показателях аденокарциномы и плоскоклеточного рака не выявлено (таблица 4-5).

Таблица 4 – Содержание CAP1 и кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от гистологического типа опухоли

Показатель	Первичная опухоль		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
CAP1 (пг/мл)	522,50 (266,50; 846,00)	428,00 (266,50; 723,00)	0,182
Кофилин (% к неизменной ткани)	134,00 (119,00; 157,00)	174,00 (135,00; 186,00)	0,186
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
CAP1 (пг/мл)	537,50 (318,00; 826,50)	453,00 (280,50; 712,50)	0,195
Кофилин (% к неизменной ткани)	188,00 (170,00; 202,00)	212,00 (182,00; 224,00)	0,179

Таблица 5 – Экспрессия мРНК CAP1 и кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от гистологического типа опухоли

Показатель	Первичная опухоль		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
CAP1	1,50 (0,16; 5,40)	3,40 (1,10; 7,30)	0,455
CFL	3,00 (1,00; 4,80)	1,60 (0,30; 2,40)	0,539
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
CAP1	0,06 (0,03; 1,24)	0,50 (0,01; 0,60)	0,389
CFL	0,55 (0,30; 6,30)	0,60 (0,20; 3,50)	0,712

Полученные результаты позволяют предположить, что изучаемые белки САР1 и кофилин являются важным звеном канцерогенеза вне зависимости от пути возникновения опухоли.

Оценивая уровень белков в опухолевой ткани в зависимости от размера первичной опухоли (Т) можно отметить повышение как уровня мРНК, так и содержания белка САР1 в ткани первичной опухоли с увеличением ее размера с $T_2N_{0-2}M_0$ до $T_3N_{0-2}M_0$ (таблица 6). Также увеличивается количество мРНК в ткани лимфогенных метастазов при увеличении Т (таблица 7). Что касается кофилина, можно отметить значимое увеличение его мРНК в ткани первичной опухоли при увеличении Т (таблица 7), но при этом уровень белка в той же ткани на стадии $T_3N_{0-2}M_0$ резко снижается в 3 раза по сравнению со стадией $T_2N_{0-2}M_0$ (рисунок 6). По всей видимости, в опухолевой клетке включаются механизмы посттрансляционной модификации кофилина, которые снижают его уровень. Так, показано, что уровень кофилина в клетке может регулироваться с помощью РНК-интерференции различными микроРНК [109; 128; 163], а также протеолитическими системами, такими как протеасомы и кальпайны [14; 104].

Изменения в уровне и экспрессии мРНК САР1 при увеличении Т могут наблюдаться из-за его участия в клеточном цикле. Например, на культуре клеток рака молочной железы и рака яичника показано, что ингибирование экспрессии САР1 в клетках приводит к торможению опухолевого роста [78; 187].

Таблица 6 – Содержание САР1 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от Т

Показатель	Первичная опухоль		p
	$T_2N_{0-2}M_0$	$T_3N_{0-2}M_0$	
	n=23	n=17	
САР1 (пг/мл)	312,50 (206,00; 334,00)	642,00 (367,00; 859,50)	0,031
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	$T_2N_{0-2}M_0$	$T_3N_{0-2}M_0$	
	n=23	n=17	
САР1 (пг/мл)	559,50 (282,00; 793,00)	688,50 (384,50; 1064,00)	0,374

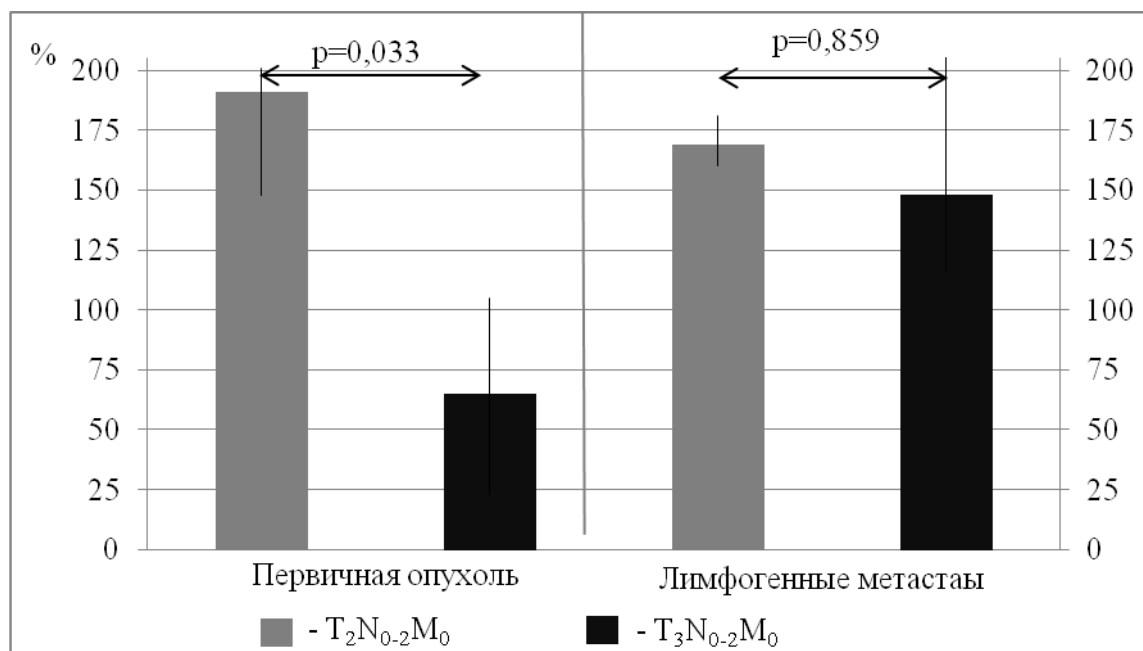


Рисунок 3 – Содержание кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от Т

Таблица 7 – Экспрессия мРНК CAP1 и кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от Т

Показатель	Первичная опухоль		p
	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
	n=23	n=17	
CAP1	1,05 (0,30; 2,30)	4,60 (2,55; 9,90)	0,005
CFL	1,60 (0,30; 3,40)	5,20 (4,40; 5,80)	<0,001
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
	n=23	n=17	
CAP1	0,03 (0,01; 0,50)	1,00 (0,56; 1,90)	0,019
CFL	0,90 (0,40; 7,70)	0,40 (0,20; 5,90)	0,557

При вовлечении в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов (N) наблюдались нелинейные изменения уровня изучаемых белков и экспрессии их мРНК в первичной опухоли и лимфогенных метастазах (таблица 8-9, рисунок 4).

На стадии $T_{2-3}N_1M_0$ в ткани наблюдалось повышение уровня экспрессии мРНК и содержания кофилина в 4,7 и 2 раза, соответственно, и повышение уровня экспрессии мРНК и содержания $CAPI$ в 2 и 2,5 раза, соответственно. При $T_{2-3}N_2M_0$ экспрессия мРНК и содержание кофилина в ткани первичной опухоли снижались в 10 и 5,5 раз, соответственно, а экспрессия мРНК и содержание $CAPI$ в 2 и 1,5 раза, соответственно.

Общеизвестно, что морфологические изменения злокачественных опухолевых клеток повышают миграционную способность клеток и приводят к инвазии и метастазированию. В определенной степени поддержание и изменение структуры и функции клеток достигается путем регулирования структуры и функции актинового цитоскелета, что является ключом к его реорганизации. $CAPI$ принимает участие в ускорении оборота актиновых филаментов путем рециркуляции кофилина и актина на обоих концах актиновой нити [194]. Прогрессирование заболевания сопровождалось значительными изменениями в работе актин-связывающих белков $CAPI$ и кофилина.

Таблица 8 – Содержание $CAPI$ в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазах в зависимости от N

Показатель	Первичная опухоль			p
	$T_{2-3}N_0M_0$	$T_{2-3}N_1M_0$	$T_{2-3}N_2M_0$	
	n=9	n=22	n=9	
$CAPI$ (пг/мл)	299,00 (240,50; 330,00)	756,00 (567,00; 858,00)	504,00 (332,00; 532,00)	$p_{12}=0,007$; $p_{13}=0,014$; $p_{23}=0,915$
Показатель	Регионарные лимфоузлы			p
	$T_{2-3}N_0M_0$	$T_{2-3}N_1M_0$	$T_{2-3}N_2M_0$	
	n=9	n=22	n=9	
$CAPI$ (пг/мл)	453,00 (244,50; 534,00)	722,00 (535,00; 840,00)	518,00 (316,00; 557,00)	$p_{12}=0,033$; $p_{13}=0,051$; $p_{23}=0,536$

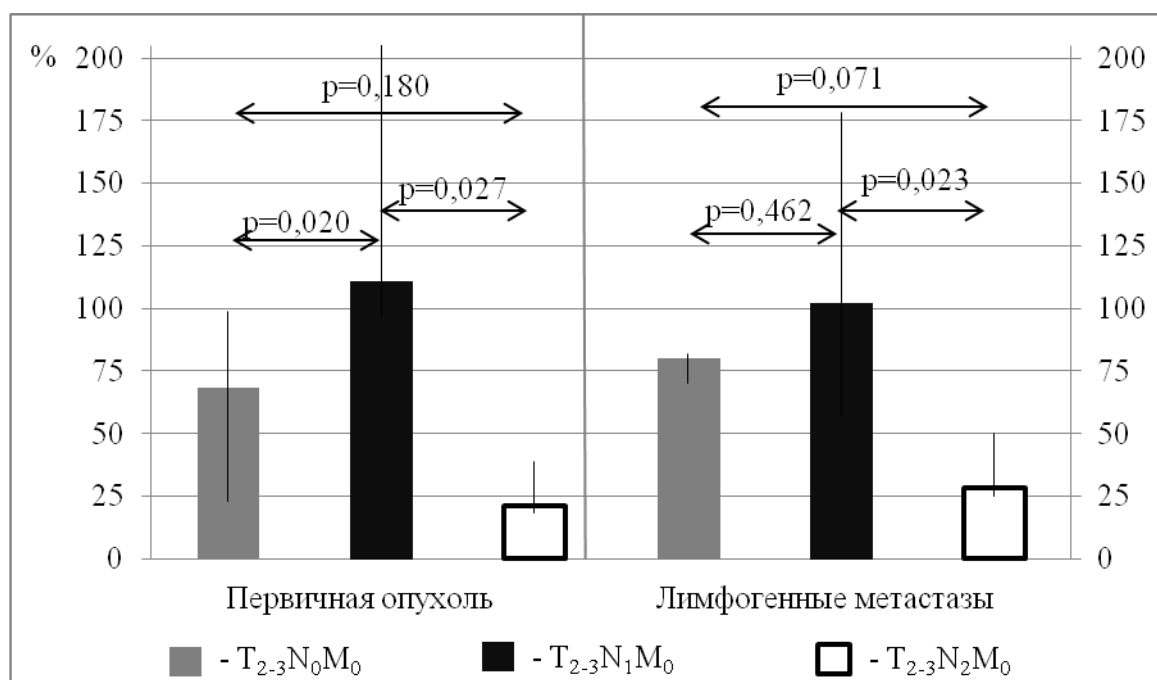


Рисунок 4 – Содержание кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от N

Таблица 9 – Экспрессия мРНК CAP1 и кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от N

Показатель	Первичная опухоль			p
	T ₂₋₃ N ₀ M ₀	T ₂₋₃ N ₁ M ₀	T ₂₋₃ N ₂ M ₀	
	n=9	n=22	n=9	
CAP1	1,70 (1,36; 2,00)	3,40 (2,72; 3,85)	1,60 (0,70; 1,90)	p ₁₂ =0,021; p ₁₃ =0,842; p ₂₃ =0,014
CFL	2,00 (1,00; 2,05)	5,40 (4,30; 5,95)	0,40 (0,04; 0,60)	p ₁₂ =0,050; p ₁₃ =0,055; p ₂₃ <0,001
Показатель	Регионарные лимфоузлы			p
	T ₂₋₃ N ₀ M ₀	T ₂₋₃ N ₁ M ₀	T ₂₋₃ N ₂ M ₀	
	n=9	n=22	n=9	
CAP1	0,07 (0,06; 0,29)	1,00 (0,30; 1,90)	0,01 (0,01; 0,35)	p ₁₂ =0,005; p ₁₃ =0,514; p ₂₃ <0,001
CFL	0,60 (0,40; 0,85)	1,10 (0,65; 2,30)	0,70 (0,40; 0,90)	p ₁₂ =0,037; p ₁₃ =0,914; p ₂₃ =0,015

В итоге, изучаемые белки показали взаимосвязь со стадией опухолевого процесса и при этом оказались одинаково изменяющимися при разных гистологических типах НМРЛ. Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что САР1 и кофилин включены в патогенез НМРЛ.

3.1.3 Актин-связывающие белки при проведении термохимиолучевой терапии

Основная задача предоперационной терапии состоит в повреждении опухолевых клеток, снижении степени их злокачественности, санации лимфатических путей корня легкого и средостения для предупреждения лимфо- и гематогенного метастазирования и, следовательно, рецидива болезни [20]. Однако, эффективность терапии НМРЛ ограничивается лекарственной устойчивостью раковых клеток. Поэтому мы также оценили содержание актин-связывающих белков и экспрессию их мРНК при применении ТХЛТ (таблица 10-11, рисунок 5).

Таблица 10 – Содержание САР1 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов после проведения термохимиолучевой терапии

Показатель	Первичная опухоль		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
САР1 (пг/мл)	621,00 (299,00; 834,00)	587,00 (269,50; 859,00)	0,711
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
САР1 (пг/мл)	652,00 (501,00; 801,00)	480,00 (308,50; 509,00)	0,054

Таблица 11 – Экспрессия мРНК CAP1 и кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазах после проведения термохимиолучевой терапии

Показатель	Первичная опухоль		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
CAP1	3,05 (0,30; 7,30)	3,15 (0,40; 5,90)	0,932
CFL	2,00 (0,30; 5,80)	1,15 (0,10; 2,20)	0,427
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
CAP1	0,29 (0,01; 1,40)	6,55 (3,30; 9,80)	0,021
CFL	0,70 (0,20; 1,20)	1,40 (1,35; 2,20)	0,083

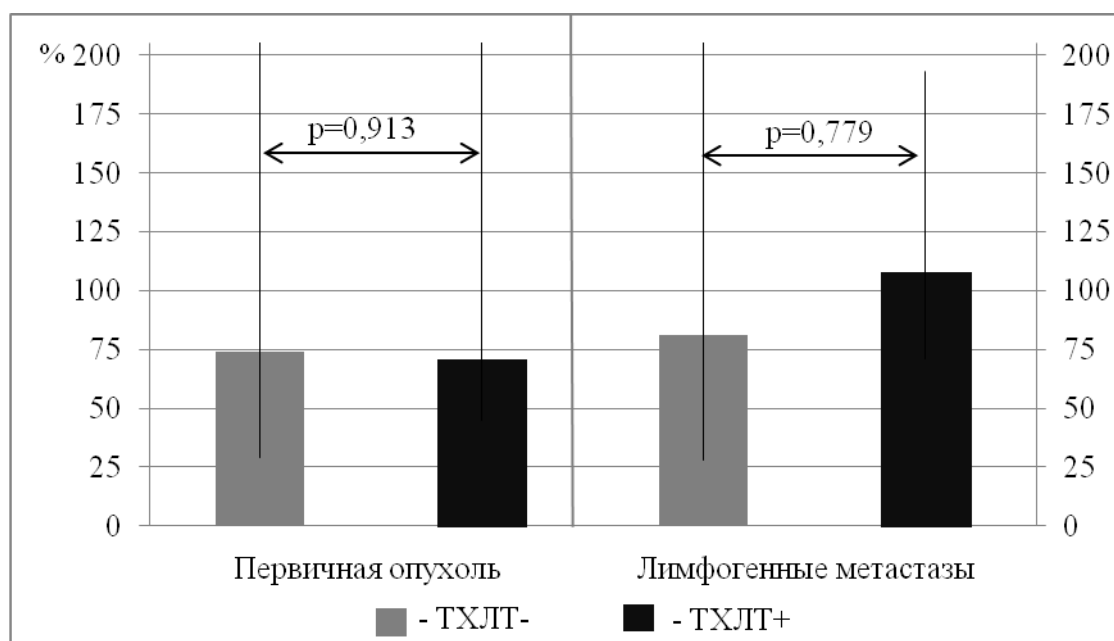


Рисунок 5 – Содержание кофилина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазах после проведения термохимиолучевой терапии

Среди полученных результатов, значимые изменения наблюдались в уровне мРНК и содержании CAP1 в лимфогенных метастазах. Здесь можно отметить сильно выраженное повышение (в 23 раза) экспрессии мРНК CAP1 при значимом снижении уровня данного белка (в 1,4 раза) в лимфогенных метастазах при

проведении ТХЛТ. Механизмы этих разнонаправленных изменений в экспрессии мРНК CAP1 и содержании белка не изучены.

Кроме важной роли CAP1 в реорганизации цитоскелета показано его участие в других внутриклеточных процессах. Так, CAP1 регулирует запуск митохондриально-зависимого пути апоптоза: при обработке клеток разных линий индуцирующим апоптоз агентом (стауроспорином) наблюдалась транслокация CAP1 в митохондрии, что явилось проапоптозным событием [173]. Такой физиологической функцией CAP1 можно объяснить повышение экспрессии его мРНК в ответ на предоперационную терапию. Но одновременно с этим в опухолевых клетках наблюдалось снижение уровня самого белка CAP1. Это возможно благодаря ускоренной деградации белка протеолитическими системами клетки, которые также активируются при терапии опухоли [39].

Эффективность ТХЛТ оценивалась по результатам инструментального исследования (рентгенологическое исследование, спиральная компьютерная томография и фибробронхоскопия) по шкале RECIST. Под объективным ответом на ТХЛТ подразумевалась полная (1 случай, 5%) и частичная (17 случаев, 85%) регрессия опухоли, под отсутствием объективного ответа – стабилизация (2 случая, 10%) и прогрессирование (0 случаев, 0%). Здесь и далее из-за отсутствия адекватной группы сравнения между пациентами с объективным ответом (18 человек) и с его отсутствием (2 человека), влияние изучаемых показателей на эффективность ТХЛТ не исследовали.

Таким образом, показано изменение содержания и экспрессии мРНК CAP1 в лимфогенных метастазах при проведении ТХЛТ. Такие изменения могут отражать участие CAP1 в сигнальных путях, связанных с проведением апоптотического сигнала внутрь клетки при лечении, а также указывать на разрушение протеолитическими системами. Возможно, в дальнейшем данные показатели будут адекватны при оценке эффективности ТХЛТ.

3.1.4 В-катенин в опухолевой и неизменной ткани легкого

На следующем этапе исследования было изучено содержание белка клеточной адгезии β -катенина (общей и фосфорилированной по серину-45 фракций) в опухолевой, неизменной и метастатической ткани больных НМРЛ (рисунок 6). Наблюдалось увеличение общей на 75% и фосфорилированной на 35% фракций белка в ткани первичной опухоли по сравнению с неизменной тканью при снижении данных фракций в регионарных метастазах (снижение общей фракции β -катенина в ткани первичной опухоли на уровне тенденции: $p < 0,1$).

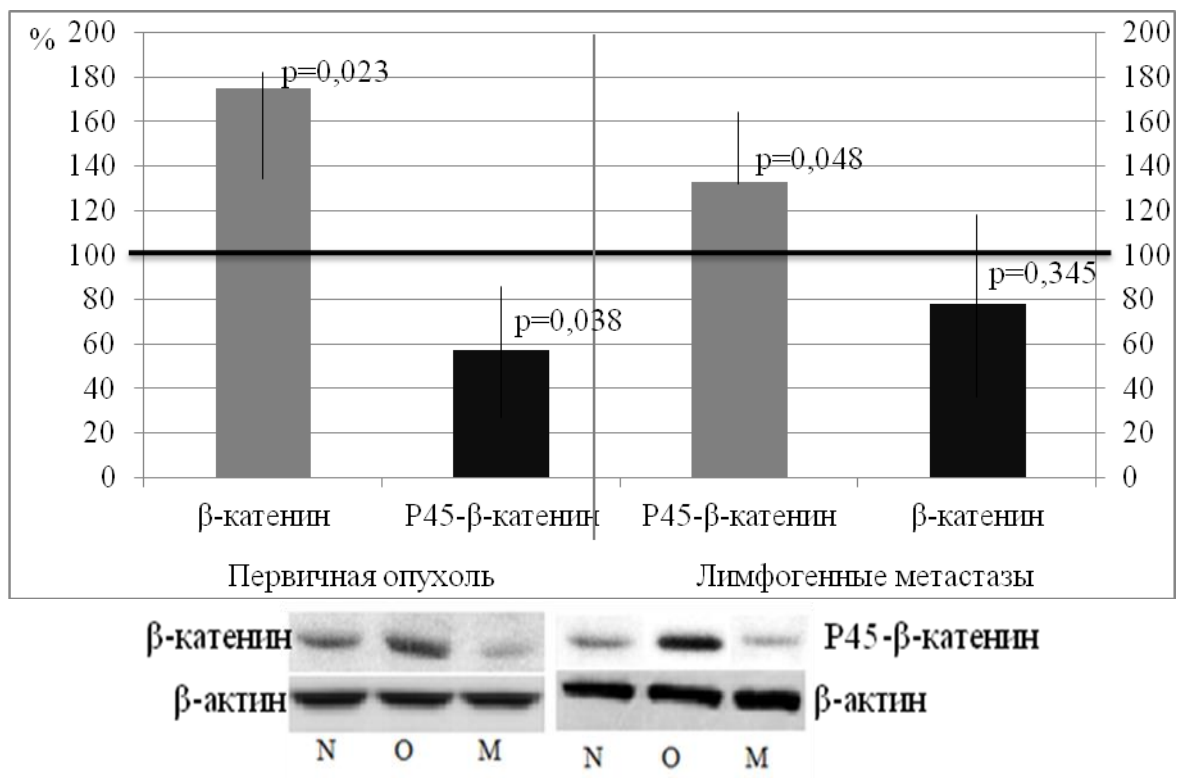


Рисунок 6 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β -катенина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов

Примечание – за 100% принято содержание белка в неизменной ткани; N – неизменная ткань легкого, O – ткань первичной опухоли, M – ткань лимфогенных метастазов.

Согласно современным данным, мутации, приводящие к аномальному взаимодействию β -катенина с комплексом деструкции, играют ключевую роль в развитии различных опухолей. Изменение экспрессии β -катенина начинают происходить уже на ранних этапах формирования опухолевого фенотипа. В многочисленных исследованиях показано, что нормальное функционирование β -катенина и его сигнального пути имеет большое значение для поддержания равновесия между стволовыми, делящимися и дифференцирующимися клетками кишечного эпителия. Нарушение этого баланса в ткани может лежать в основе развития злокачественной опухоли [10]. В-катенин является ключевым модулятором пролиферации и выживания опухолевых клеток [167]. Также было обнаружено, что данный белок способен поддерживать рост опухоли путем стимуляции ангиогенеза за счет участия в регуляции экспрессии эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) [146]. В-катенин регулирует экспрессию генов матриксных металлопротеиназ (MMP2, MMP7, MMP9, MMP26), продукты которых играют роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции, дифференцировке клеток, апоптозе [137].

В ткани первичной опухоли НМРЛ повышение уровня β -катенина как раз может свидетельствовать о такой его вовлеченности в опухолевую прогрессию. В ткани же лимфогенных метастазов снижается содержание фракций β -катенина по сравнению с тканью нормальных лимфоузлов, что отражает процесс МЭП и свидетельствует о снижении адгезивности опухолевых клеток, пришедших для формирования нового опухолевого очага.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о повышении уровня β -катенина в ткани первичной опухоли и снижении в ткани лимфогенных метастазов по сравнению с неизменной тканью, что подтверждает значимость β -катенина в метастазировании рака легкого.

3.1.5 Изменение β -катенина в зависимости от гистологического типа опухоли, распространенности опухолевого процесса

При изучении уровня фракций β -катенина в зависимости от гистологического типа опухоли различия в показателях между аденокарциномой и плоскоклеточным раком не выявлено (таблица 12). Полученные результаты показывают, что β -катенин важен для распространения опухолей обоих гистологических типов и является важным звеном канцерогенеза вне зависимости от пути возникновения опухоли.

Далее был изучен уровень фракций β -катенина в зависимости от размера первичной опухоли (T). В ткани первичной опухоли и в ткани лимфогенных метастазов наблюдалось снижение содержания общего β -катенина при двукратном увеличении его фосфорилированной фракции при увеличении размера с T₂N₀₋₂M₀ до T₃N₀₋₂M₀ (рисунок 7-8).

Таблица 12 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β -катенина в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от гистологического типа опухоли

Показатель	Первичная опухоль		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
β -катенин (% к неизменной ткани)	168,00 (136,00; 218,00)	153,00 (115,00; 180,00)	0,875
P45- β -катенин (% к неизменной ткани)	142,00 (123,00; 143,00)	156,00 (114,00; 206,00)	0,823
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
β -катенин (% к неизменной ткани)	87,00 (62,00; 107,00)	60,00 (29,00; 103,00)	0,738
P45- β -катенин (% к неизменной ткани)	101,00 (47,00; 143,00)	41,00 (23,00; 75,00)	0,596

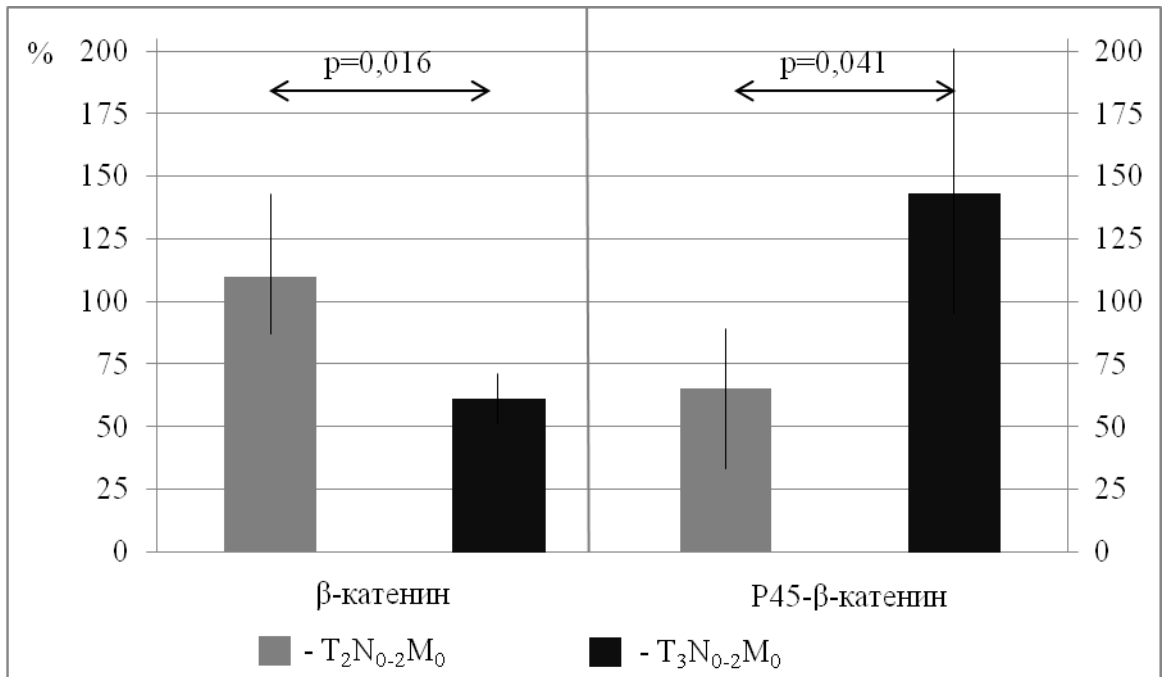


Рисунок 7 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β-катенина в ткани первичной опухоли в зависимости от Т

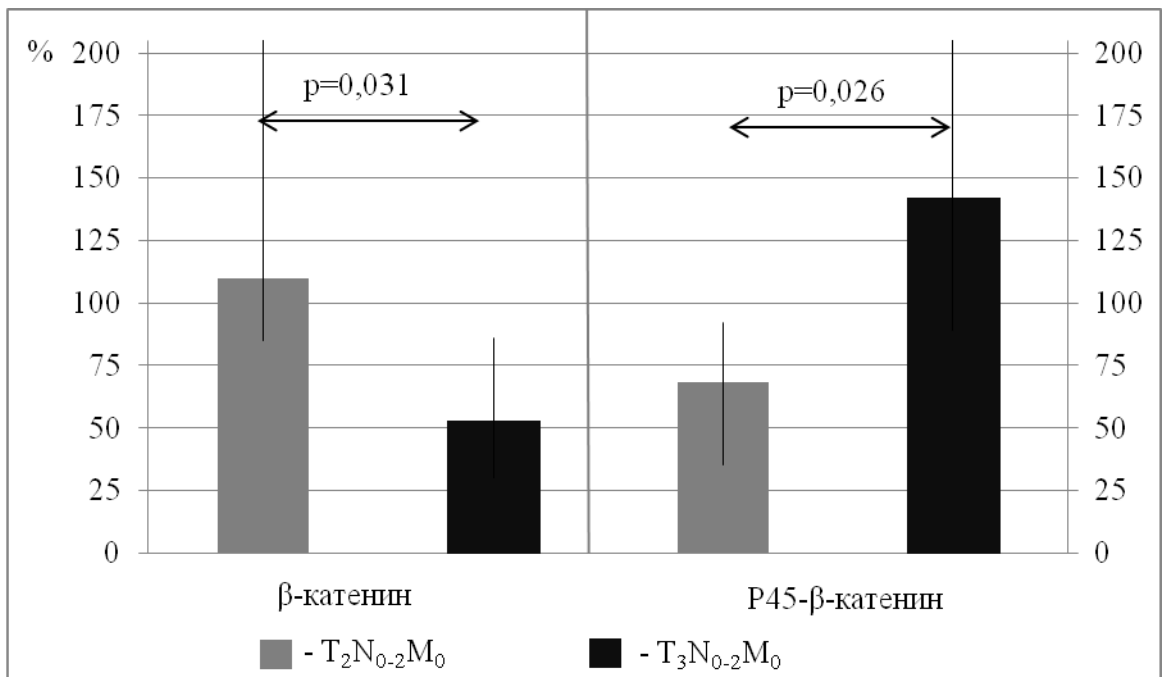


Рисунок 8 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β-катенина в ткани лимфогенных метастазов в зависимости от Т

С увеличением распространенности первичной опухоли изменяются ее характеристики: возрастает способность к инвазии и метастазированию. Изменения во фракциях β -катенина при НМРЛ отражают современные представления об ЭМП, который происходит при опухолевой инвазии и метастазировании: фосфорилированная фракция β -катенина увеличивается, так как является следствием изменения адгезивности клеток [17].

Уровень фракций β -катенина в ткани первичной опухоли на стадии $T_{2-3}N_1M_0$ также сначала возрастал, а затем снижался при $T_{2-3}N_2M_0$. В ткани лимфогенных метастазов изменения были аналогичны, но статистически подтверждены только различия между стадиями $T_{2-3}N_0M_0$ и $T_{2-3}N_1M_0$ для общей и между $T_{2-3}N_1M_0$ и $T_{2-3}N_2M_0$ для фосфорилированной фракции β -катенина (рисунок 9-10).

β -катенин участвует в механизмах метастазирования опухолей, усиливая способность клеток к миграции и инвазии. Как уже упоминалось выше, данный белок регулирует экспрессию генов матричных металлопротеиназ и генов-мишеней в фибробластах, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках, эндотелиальных клетках, чем влияет на опухолевое микроокружение [63; 137]. Перечисленные функции β -катенина оказывают прямое значение на опухолевую прогрессию и метастазирование.

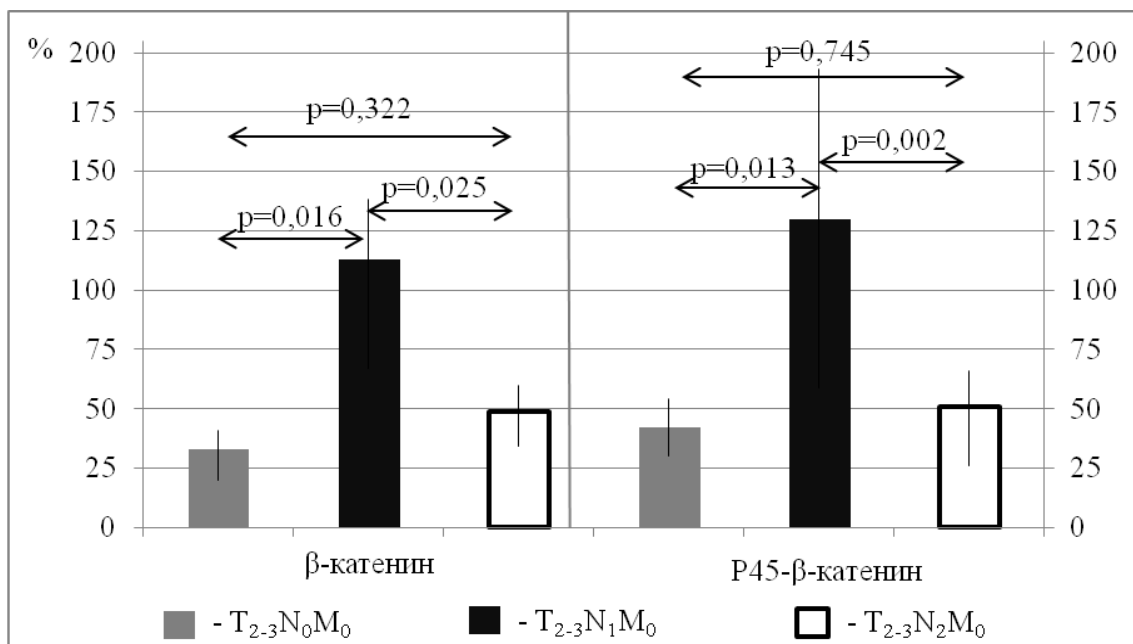


Рисунок 9 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β -катенина в ткани первичной опухоли в зависимости от N

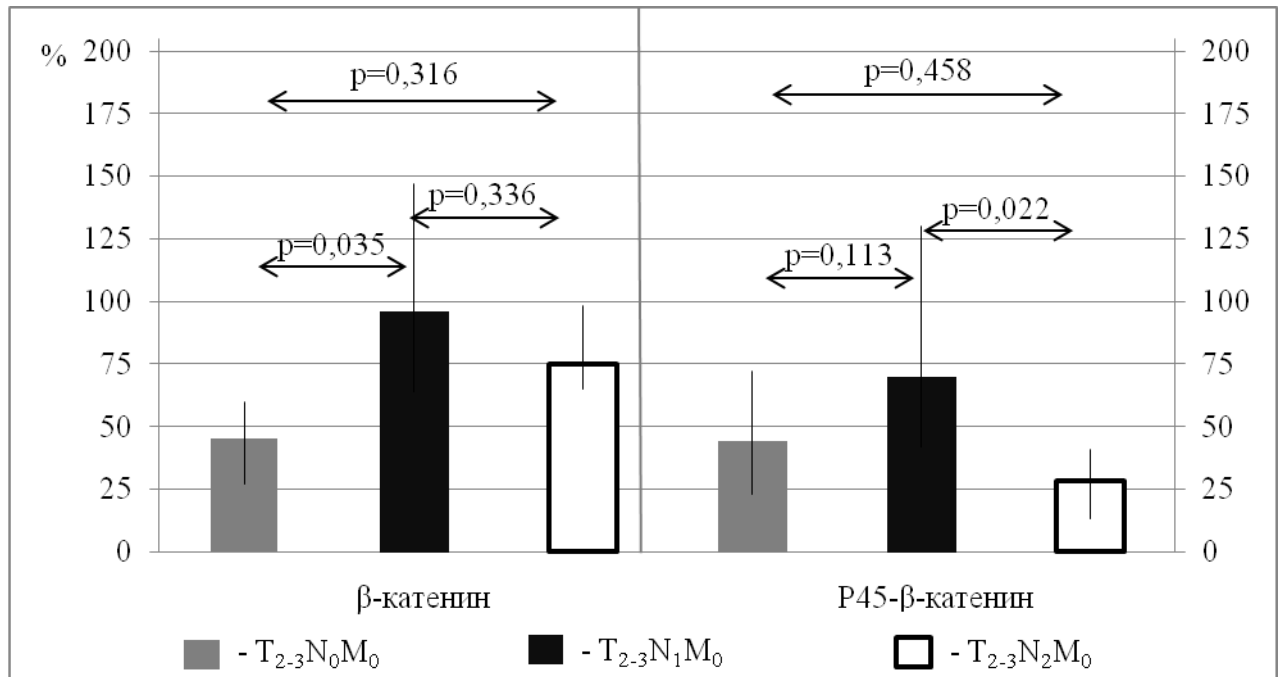


Рисунок 10 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β-катенина в ткани лимфогенных метастазов в зависимости от N

Полученные в нашем исследовании данные об изменении фракций β-катенина могут говорить о том, что на начальных этапах метастазирования в опухоли используется канонический, β-катенин-зависимый путь для увеличения агрессивности [168]. В дальнейшем в опухоли происходит переключение на β-катенин-независимые пути, которые регулируют полярность клетки, стимулируют реорганизацию цитоскелета [70; 118] и метаболизм кальция [99].

Нарушение сигнальной и адгезивной функции β-катенина выявлены также при раках других локализаций, но при этом опубликованные работы показывают разностороннюю роль и направленность изменений цитозольного и мембранного фракций β-катенина в механизмах опухолевой прогрессии [10]. Исследования в этом направлении продолжаются.

В результате, β-катенин значительно изменялся в опухолевой ткани при НМРЛ во взаимосвязи со стадией опухолевого процесса, но не отличался в ткани при различных гистологических типах опухоли. Участие β-катенина в опухолевой прогрессии НМРЛ не вызывает сомнений, однако остается открытым вопрос о механизмах нарушения его адгезивной и сигнальной функций.

3.1.6 В-катенин при проведении термохимиолучевой терапии

Не исключена роль β -катенина в поддержании химиорезистентности опухолевых клеток, поэтому в нашей работе было оценено изменение уровня общей и фосфорилированной фракций β -катенина в опухолевой ткани НМРЛ и ткани лимфогенных метастазов при проведении ТХЛТ (рисунок 11-12).

Также как и при изучении работы актин-связывающих белков во взаимосвязи с проведением ТХЛТ (глава 3.1.3), значимые изменения в содержании β -катенина наблюдались только в лимфогенных метастазах. Наблюдалось повышение общей фракции β -катенина при снижении его фосфорилированной формы, что говорит о стабилизации межклеточных контактов и торможении канонического Wnt/ β -катенин-сигнального пути в опухолевом клоне.

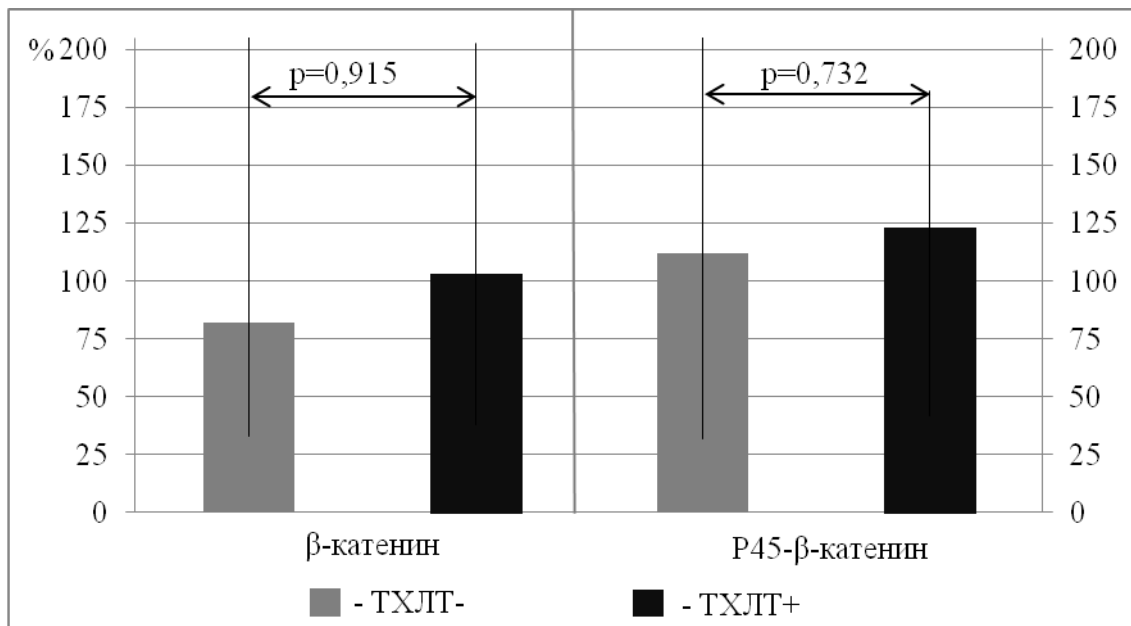


Рисунок 11 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β -катенина в ткани первичной опухоли при проведении термохимиолучевой терапии

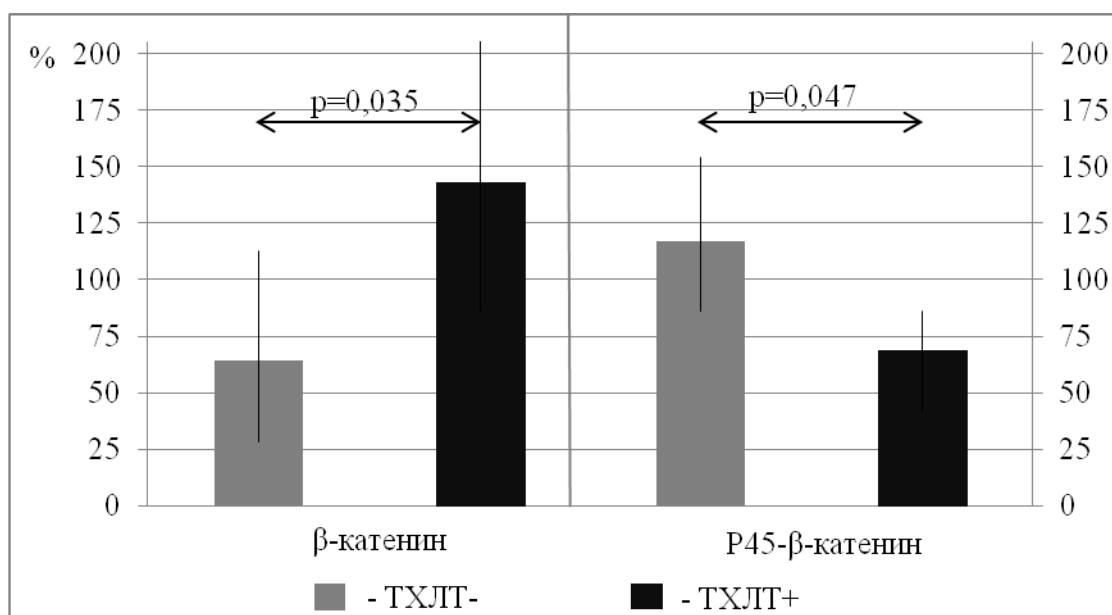


Рисунок 12 – Содержание общей и фосфорилированной фракций β-катенина в ткани лимфогенных метастазов при проведении термохимиолучевой терапии

Наиболее важной для опухоли ролью Wnt/β-катенин-сигнального пути является его способность поддержания фенотипа опухолеиницилирующих клеток и ЭМП, необходимых для метастазирования опухоли [25]. По-видимому, данная функция блокируется в клетках лимфогенных метастазов при проведении ТХЛТ. Снижение цитозольной фракции β-катенина возможно за счет его протеасомной деградации в опухолевых клетках после проведенной терапии [134; 190]. Это также препятствует активации Wnt/β-катенин-сигнального пути за счет ингибирования транслокации β-катенина в ядро.

Таким образом, показано изменение содержания β-катенина в лимфогенных метастазах при проведении ТХЛТ. Вероятно, ТХЛТ приводит к стабилизации межклеточных контактов в опухолевых клетках лимфогенных метастазов, а также к разрушению избыточного цитозольного β-катенина протеолитическими системами клетки.

3.2 Система контроля качества клеточного протеома при немелкоклеточном раке легкого

Для функционирования и адекватного биологического ответа опухолевых клеток на изменяющиеся условия необходимо поддерживать сохранность клеточного протеома, что обеспечивается работой шаперонов и энергозависимых протеаз [18]. Молекулярные шапероны, в число которых входят малые белки теплового шока, осуществляют фолдинг, рефолдинг, и мисфолдинг протеинов, поддерживают функциональную активность внутриклеточных белков, а протеазы, представителями которых являются протеасомы и кальпаины, деградируют аномальные, поврежденные и выполнившие свою функцию белки или осуществляют частичный протеолиз для регуляции активности клеточных белков [22]. Практически не изучено состояние этих систем при НМРЛ.

3.2.1 Протеасомы, кальпаины и HspB5 в опухолевой и неизменной ткани легкого

Исследование ХПА, КПА протеасом, содержания субъединиц тотального пула протеасом ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$), активности кальпаинов и экспрессии их мРНК (CAPN1 и CAN2), а также уровня HspB5 проведено у 60 больных НМРЛ (40 человек без предоперационной терапии, 20 человек, которым перед оперативным вмешательством проводилась ТХЛТ). Изучаемые показатели оценивали в опухолевой и неизменной ткани, ткани лифогенных метастазов и нормальных регионарных лимфоузлов; сопоставляли с основными клинико-морфологическими параметрами (гистологический тип, стадия заболевания), а также оценивали влияние ТХЛТ на изменение показателей. Результаты, отражающие активность протеасом, кальпаинов и содержание HspB5 в опухолевой и неизменной ткани больных НМРЛ представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Активность протеасом, кальпаинов и содержание HspB5 в опухолевой, неизменной и метастатической ткани у больных немелкоклеточным раком легкого

Показатель	Неизменная ткань	Первичная опухоль	Лимфогенные метастазы	p
	n=40	n=40	n=31	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	11,45 (5,89; 19,50)	41,42 (24,73; 78,77)	36,63 (21,76; 56,25)	p ₁₂ <0,001; p ₁₃ <0,001; p ₂₃ =0,114
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	14,19 (10,16; 19,78)	31,39 (16,77; 63,51)	27,42 (11,59; 44,82)	p ₁₂ =0,038; p ₁₃ =0,009; p ₂₃ =0,225
АК (10 ³ Ед/мг белка)	36,38 (17,00; 57,19)	87,69 (46,97; 178,42)	67,01 (32,81; 161,11)	p ₁₂ =0,047; p ₁₃ =0,010; p ₂₃ =0,445
HspB5 (пг/мл)	400,00 (344,00; 444,00)	365,00 (294,00; 403,00)	343,00 (297,00; 382,00)	p ₁₂ =0,294; p ₁₃ =0,153; p ₂₃ =0,750

Примечание – ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом, КПА – каспазаподобная активность протеасом, АК – активность кальпаинов.

В результате проведенного исследования выявлено усиление протеасом- и кальпаин-зависимого протеолиза в ткани первичного опухолевого очага и ткани лимфогенных метастазов по сравнению с соответствующей неизменной тканью. В ткани первичной опухоли ХПА и КПА протеасом была выше, чем в неизменной ткани в 3,6 и 2,2 раза соответственно; в ткани лимфогенных метастазов – в 3,1 и 1,9 раз соответственно. АК также была выше в первичной опухоли в 2,4 раза и в метастатических лимфоузлах в 1,8 раз по сравнению с неизменной тканью. При этом содержание малого белка теплового шока HspB5 значительно не изменяется.

Оценку количества протеасом в клетках измеряли по экспрессии субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, входящих в состав ядра протеасом. Показано значимое снижение экспрессии данных субъединиц (на 40%) в лимфогенных метастазах по сравнению с неизменной тканью. При этом в тканях первичной опухоли отмечено незначимое увеличение экспрессии субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$, на 10%, по сравнению с неизменной тканью (рисунок 13).

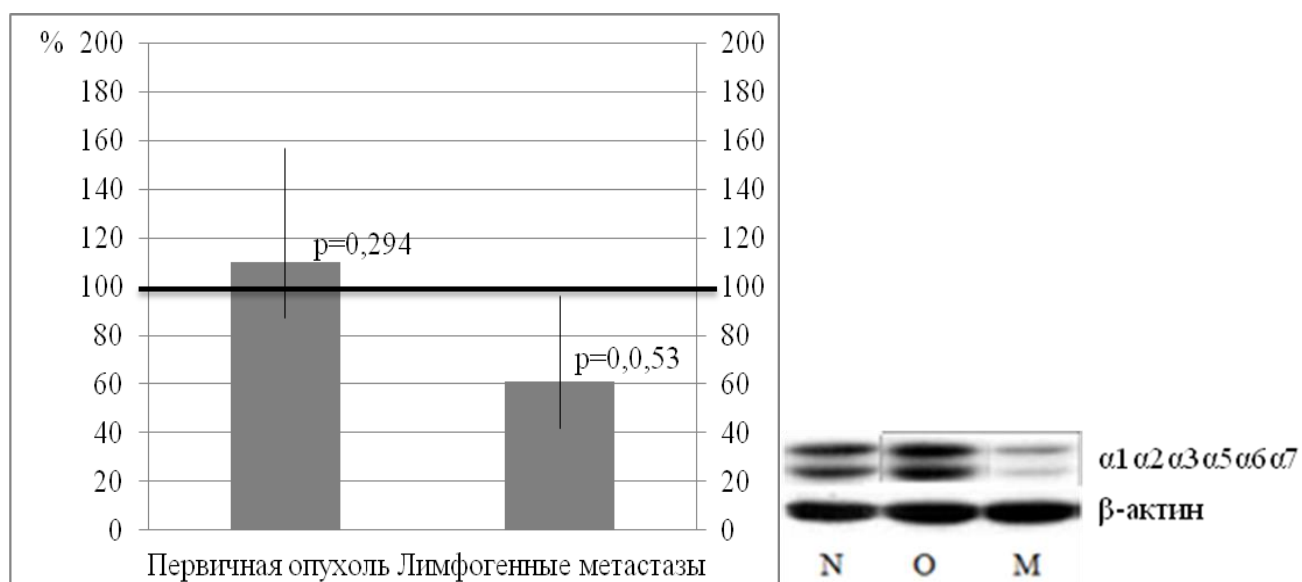


Рисунок 13 – Содержание субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ протеасом в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов

Примечание – за 100% принято содержание белка в неизменной ткани; N – неизменная ткань легкого, O – ткань первичной опухоли, M – ткань лимфогенных метастазов.

Полученные результаты о повышении активности протеасом в злокачественной ткани по сравнению с неизменной согласуются с имеющимся в литературе данным и по другим локализациям, таким как плоскоклеточные карциномы головы и шеи, рак эндометрия, рак желудка, колоректальный рак и рак молочной железы, в то время как известно, что при раке почки и мочевого пузыря этот показатель снижается или не изменяется [14; 24]. Также в литературе имеются данные о повышении активности кальпаинов в опухолевой ткани при раке эндометрия, молочной железы, желудка и толстой кишки по сравнению с неизменной тканью [8; 13; 29].

Вероятно, повышение активности протеасом и кальпаинов при НМРЛ по сравнению с неизменными тканями происходит вследствие возрастающей интенсивности внутриклеточных процессов. Опухолевый рост сопровождается нарушением клеточного цикла, усилением пролиферации, ингибированием апоптоза [142]. Несомненно, чтобы клетке продолжать свое существование, необходимо усилить протеасомную систему, субстратами для протеолиза которой

являются белки-регуляторы клеточного цикла, рецепторы эстрогенов и прогестерона, компоненты системы инсулиноподобных факторов роста, многие транскрипционные факторы, белки pRb и p53, ингибитор NF-κB IκB, белки, контролирующие активность каспаз, компоненты сигнальных путей, [58]. Также в опухолевой клетке происходят такие процессы как нарушение межклеточной адгезии, перестройка актинового цитоскелета, морфологическая трансформация и клеточная миграция, в которых кальпаины деградируют многие сигнальные и структурные белки [3; 106].

При возрастающей активности протеасом было отмечено незначимое увеличение их количества (о котором судили по экспрессии их тотального пула) в тканях первичной опухоли, а в ткани лимфогенных метастазов этот показатель снижался. Повышение активности протеасом при неизменном или сниженном их содержании в тканях опухолей и метастазах, вероятно, связано с изменением субъединичного состава протеасом. В частности, в тканях рака молочной железы, эндометрия, желудка, ободочной кишки было показано повышение уровня регуляторных субчастиц и иммунных субъединиц, которые могут существенно модифицировать активность протеасом [15; 143].

Следует отметить, что неизменяющееся содержание белка HspB5 может быть связано с тем, что гиперактивация кальпаинов вызывает деградацию белков кристаллинов, к семейству которых относится HspB5 [111; 123].

В заключении можно отметить, что наблюдается повышение активности протеасом и кальпаинов в опухолевой ткани по сравнению с неизменной, а также снижение субъединиц тотального пула протеасом в ткани лимфогенных метастазов по сравнению с неизменной тканью лимфоузлов.

3.2.2 Протеасомы, кальпаины и HspB5 в зависимости от гистологического типа опухоли, распространенности опухолевого процесса

Изучаемые показатели системы контроля качества клеточного протеома значимо не различались в опухолевой ткани различных гистологических типов (таблица 14).

Наиболее значимым фактором, определяющим прогноз заболевания и тактику лечения НМРЛ, является стадия заболевания, отражающая размер первичного новообразования (Т) и вовлеченность в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов (N). В таблице 15-16 и на рисунке 14 показано изменение изучаемых показателей протеасом, кальпаинов и HspB5 в ткани НМРЛ в зависимости от Т.

Значимые изменения при увеличении распространенности первичного очага наблюдались только в АК и экспрессии их мРНК, причем отмечалось значимое снижение показателей с увеличением размера первичного очага: АК на стадии $T_3N_{0-2}M_0$ снижалась по сравнению со стадией $T_2N_{0-2}M_0$ как в ткани опухоли (в 2,4 раза), так и в ткани лимфогенных метастазов (в 5,1 раз); экспрессия мРНК также снижалась с увеличением Т (в 3,0-4,1 раз в первичной опухолевой ткани и в 2,1-3,6 раз в ткани лимфогенных метастазов). Такое ингибирование работы кальпаинов может происходить в опухолях под воздействием оксидативного стресса в связи с окислением цистеина в их активном центре [132].

Таблица 14 – Активность протеасом, кальпаинов, содержание HspB5, субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ протеасом и экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от гистологического типа опухоли

Показатель	Первичная опухоль		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	26,49 (25,18; 78,77)	32,47 (17,46; 42,93)	0,822
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	24,44 (21,43; 31,20)	22,69 (16,85; 41,60)	0,860
АК (10 ³ Ед/мг белка)	70,37 (31,05; 210,07)	99,31 (54,81; 214,10)	0,503
HspB5 (пг/мл)	234,50 (169,00; 320,00)	257,00 (214,00; 291,00)	0,299
$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ (% к неизменной ткани)	109,00 (21,00; 137,00)	42,00 (29,00; 102,00)	0,153
CAPN1	4,61 (1,45; 7,13)	4,36 (1,16; 8,40)	0,294
CAPN2	0,54 (0,02; 1,03)	0,21 (0,00; 0,32)	0,750
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	Аденокарцинома	Плоскоклеточный рак	
	n=23	n=17	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	36,63 (8,79; 42,88)	20,08 (9,69; 61,91)	0,875
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	13,48 (10,59; 29,09)	17,47 (9,52; 37,07)	0,823
АК (10 ³ Ед/мг белка)	73,12 (24,09; 97,01)	92,17 (76,59; 154,28)	0,911
HspB5 (пг/мл)	243,00 (191,00; 321,00)	255,00 (216,50; 279,50)	0,596
$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ (% к неизменной ткани)	55,00 (36,00; 128,00)	50,00 (25,00; 79,00)	0,738
CAPN1	0,36 (0,03; 1,04)	0,50 (0,01; 0,60)	0,983
CAPN2	0,41 (0,05; 1,16)	0,49 (0,20; 1,50)	0,962

Примечание – ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом, КПА – каспазаподобная активность протеасом, АК – активность кальпаинов.

Таблица 15 – Активность протеасом, кальпаинов и содержание HspB5 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от Т

Показатель	Первичная опухоль		p
	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
	n=23	n=17	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	44,44 (34,44; 55,52)	41,42 (25,68; 77,57)	0,689
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	22,69 (15,46; 40,82)	31,20 (22,77; 70,41)	0,749
АК (10 ³ Ед/мг белка)	113,25 (69,66; 194,57)	46,97 (36,06; 87,70)	0,022
HspB5 (пг/мл)	280,50 (174,50; 357,00)	248,00 (204,00; 268,00)	0,343
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
	n=23	n=17	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	20,08 (11,76; 62,11)	36,63 (7,39; 42,27)	0,177
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	19,94 (10,59; 75,96)	27,30 (11,34; 39,44)	0,452
АК (10 ³ Ед/мг белка)	168,75 (67,01; 237,50)	33,12 (21,33; 76,59)	0,007
HspB5 (пг/мл)	241,00 (184,00; 276,50)	251,00 (201,00; 314,00)	0,460

Примечание – ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом, КПА – каспазаподобная активность протеасом, АК – активность кальпаинов.

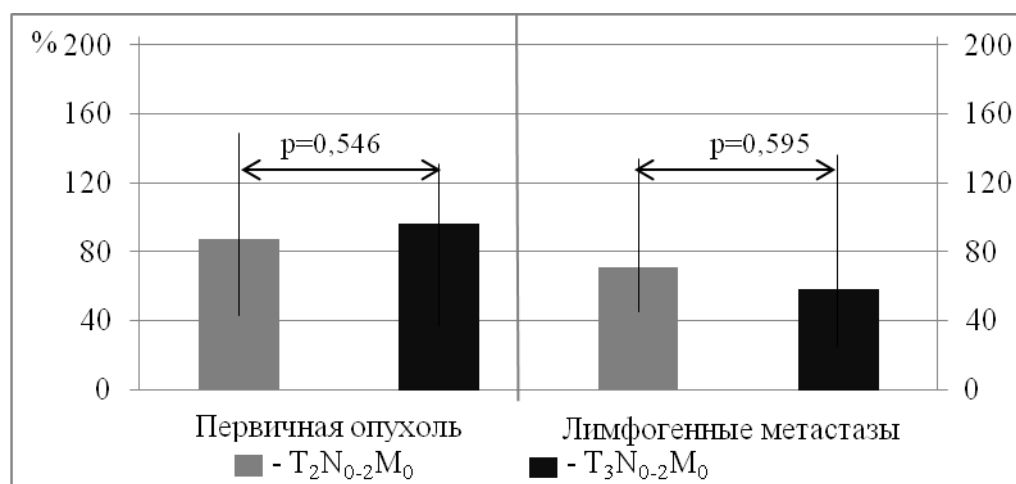


Рисунок 14 – Содержание субъединиц α1α2α3α5α6α7 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от Т

Таблица 16 – Экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от Т

Показатель	Первичная опухоль		p
	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
	n=23	n=17	
CAPN1	24,57 (21,09; 27,05)	8,17 (8,15; 11,99)	<0,001
CAPN2	28,80 (20,67; 31,93)	7,03 (4,40; 7,70)	<0,001
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	T ₂ N ₀₋₂ M ₀	T ₃ N ₀₋₂ M ₀	
	n=23	n=17	
CAPN1	22,66 (20,01; 23,96)	11,00 (0,56; 1,90)	0,015
CAPN2	39,79 (35,64; 40,94)	10,98 (10,90; 15,90)	0,005

При анализе особенностей изменения ХПА, КПА протеасом и АК, а также содержания HspB5 при НМРЛ в зависимости от распространенности опухолевого процесса на регионарные лимфоузлы выявлено нелинейное изменение ХПА и КПА в тканях первичных опухолей. При T₂₋₃N₁M₀ снижались ХПА и КПА по сравнению с первичными опухолями стадии T₂₋₃N₀M₀, при T₂₋₃N₂M₀ наблюдалось повышение активностей протеасом, в частности, КПА протеасом резко возрастала (p<0,01), а ХПА протеасом имела тенденцию к возрастанию (p<0,1) (таблица 17). Содержание тотального пула протеасом в ткани первичной опухоли при метастазировании рака легкого значимо снижалось только на стадии T₂₋₃N₂M₀ по сравнению с первичными опухолями стадии T₂₋₃N₁M₀ (рисунок 15).

В ткани лимфогенных метастазов наблюдались изменения активности протеасом, схожие с первичными опухолями. При этом экспрессия субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ сначала увеличивалась в 3 раза при появлении опухолевого процесса в лимфогенных метастазах (T₂₋₃N₁M₀), а затем в 2 раза снижалась при T₂₋₃N₂M₀ (рисунок 15, таблица 18). Разнонаправленное изменение активности и уровня протеасом можно объяснить действием их регуляторных субъединиц Rpt6, Pa28 β [4], которые также могут изменяться в ответ на лимфогенное

метастазирование [14]. Подобные волнообразные изменения активности протеасом также встречались в тканях рака молочной железы [29]. В то же время содержание HspB5, АК и экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2 значимо не изменялась в опухолевых тканях при лимфогенном метастазировании (таблица 17-18).

Таблица 17 – Активность протеасом, кальпаинов и содержание HspB5 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов в зависимости от N

Показатель	Первичная опухоль			p
	T ₂₋₃ N ₀ M ₀	T ₂₋₃ N ₁ M ₀	T ₂₋₃ N ₂ M ₀	
	n=9	n=22	n=9	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	50,22 (44,44; 55,52)	26,49 (9,92; 32,22)	41,42 (32,47; 100,00)	p ₁₂ =0,045; p ₁₃ =0,154; p ₂₃ =0,034
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	50,53 (47,70; 54,79)	23,40 (18,07; 40,82)	57,45 (47,81; 62,98)	p ₁₂ =0,027; p ₁₃ =0,729; p ₂₃ =0,012
АК (10 ³ Ед/мг белка)	61,96 (32,98; 94,57)	99,31 (69,66; 110,07)	46,97 (31,02; 102,66)	p ₁₂ =0,547; p ₁₃ =0,770; p ₂₃ =0,145
HspB5 (пг/мл)	275,50 (221,00; 350,00)	245,00 (187,00; 306,00)	291,00 (265,00; 303,00)	p ₁₂ =0,334; p ₁₃ =0,754; p ₂₃ =0,750
Показатель	Лимфогенные метастазы			p
	T ₂₋₃ N ₀ M ₀	T ₂₋₃ N ₁ M ₀	T ₂₋₃ N ₂ M ₀	
	n=9	n=22	n=9	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	42,88 (41,67; 45,00)	20,08 (8,45; 39,15)	47,60 (38,79; 53,15)	p ₁₂ =0,035; p ₁₃ =0,541; p ₂₃ =0,034
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	47,12 (37,23; 71,32)	15,08 (7,35; 28,87)	37,74 (30,39; 41,98)	p ₁₂ =0,029; p ₁₃ =0,559; p ₂₃ =0,032
АК (10 ³ Ед/мг белка)	45,84 (37,24; 146,04)	92,17 (25,85; 187,60)	39,44 (31,98; 76,59)	p ₁₂ =0,098; p ₁₃ =0,710; p ₂₃ =0,056
HspB5 (пг/мл)	198,00 (105,00; 288,00)	261,00 (215,00; 294,50)	222,00 (211,00; 271,00)	p ₁₂ =0,774; p ₁₃ =0,853; p ₂₃ =0,880

Примечание – ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом, КПА – каспазаподобная активность протеасом, АК – активность кальпаинов.

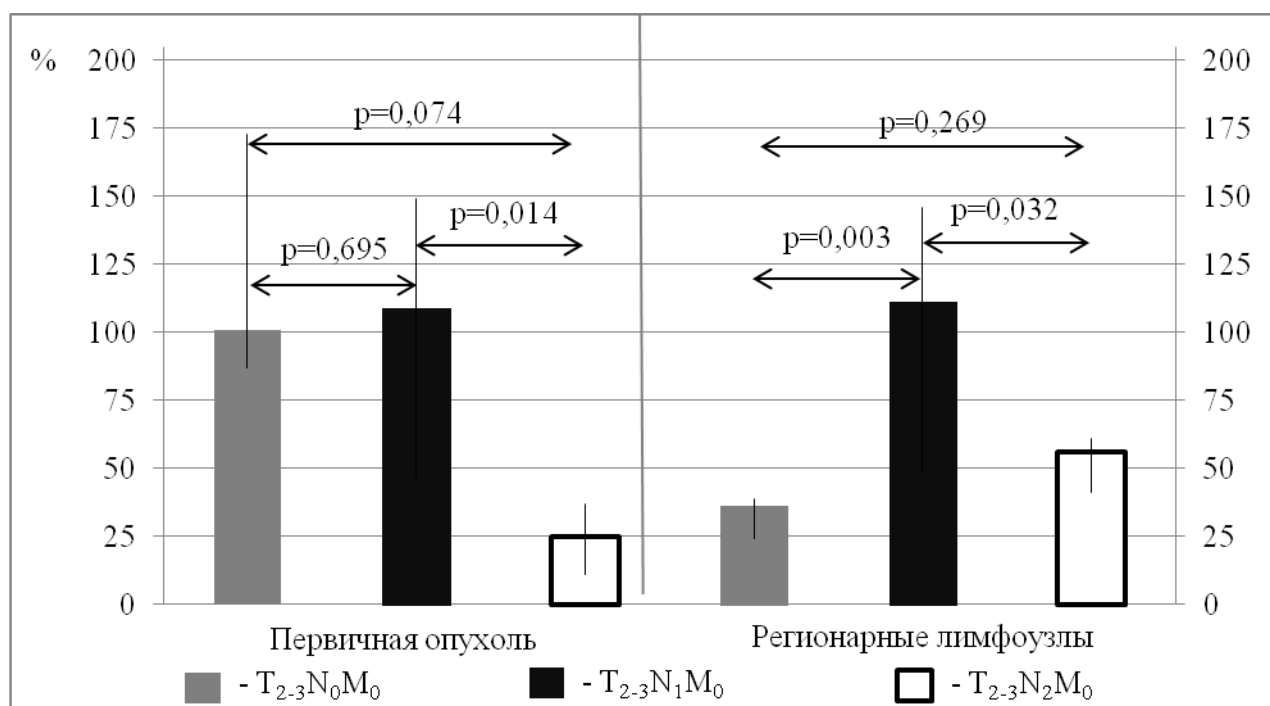


Рисунок 15 – Содержание субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha b\alpha 7$ в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазах в зависимости от N

Таблица 18 – Экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазах в зависимости от N

Показатель	Первичная опухоль			p
	$T_{2-3}N_0M_0$ n=9	$T_{2-3}N_1M_0$ n=22	$T_{2-3}N_2M_0$ n=9	
CAPN1	6,70 (1,36; 7,00)	6,78 (2,72; 11,85)	4,13 (0,70; 5,90)	$p_{12}=0,921$; $p_{13}=0,642$; $p_{23}=0,223$
CAPN2	7,79 (1,00; 12,05)	4,80 (4,30; 8,95)	5,55 (5,54; 6,60)	$p_{12}=0,150$; $p_{13}=0,223$; $p_{23}=0,111$
Показатель	Регионарные лимфоузлы			p
	$T_{2-3}N_0M_0$ n=9	$T_{2-3}N_1M_0$ n=22	$T_{2-3}N_2M_0$ n=9	
CAPN1	16,16 (9,06; 20,29)	8,95 (7,30; 9,90)	8,58 (4,57; 8,85)	$p_{12}=0,115$; $p_{13}=0,114$; $p_{23}=0,991$
CAPN2	10,16 (2,40; 30,85)	12,91 (10,65; 22,30)	10,99 (5,40; 33,90)	$p_{12}=0,773$; $p_{13}=0,562$; $p_{23}=0,653$

Подытоживая вышесказанное, при увеличении размеров первичной опухоли и лимфогенном метастазировании в тканях первичных опухолей и лимфогенных метастазов НМРЛ протеасомная и кальпаиновая протеолитические системы претерпевают изменения. При увеличении размера опухоли отмечено ингибирование кальпаиновой системы, что, вероятно, связано с влиянием оксидативного стресса на работу протеолитической системы. Также обращает на себя внимание нелинейное изменение активностей протеасом и их тотального пула ($\alpha1\alpha2\alpha3\alpha5\alpha6\alpha7$) в тканях первичной опухоли и метастазов при лимфогенном метастазировании.

3.2.3 Протеасомы, кальпаины и HspB5 при проведении термохимиолучевой терапии

Изучение представителей системы контроля качества клеточного протеома при проведении ТХЛТ необходимо, т.к. изменения в этих системах могут быть, как ассоциированы с резистентностью к лечению [69; 153], так и для возможности использования показателей этих систем в качестве маркеров оценки прогноза течения НМРЛ. Активность протеасом, кальпаинов, уровень HspB5, субъединиц $\alpha1\alpha2\alpha3\alpha5\alpha6\alpha7$ и экспрессия мРНК кальпаинов в ткани НМРЛ при проведении ТХЛТ представлены в таблице 19-20, на рисунке 16.

Система контроля качества клеточного протеома в ткани лимфогенных метастазов оказалась чувствительнее к проведению терапии: отмечалось повышение активности протеасом, их субъединиц тотального пула, АК и уровня HspB5 в ответ на проведение ТХЛТ. По всей видимости, в клетках возникает необходимость утилизации разрушенных химиотерапией белков, в связи с чем, активизируются протеолитические системы клетки. В тоже время, увеличивается содержание малого белка теплового шока HspB5, что отражает попытки клеток метастатических лимфоузлов сохранить целостность разрушаемых белков.

Таблица 19 – Активность протеасом, кальпаинов и содержание HspB5 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов при проведении термохимиолучевой терапии

Показатель	Первичная опухоль		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	51,70 (26,12; 105,05)	73,38 (37,11; 215,42)	0,558
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	37,91 (20,76; 81,65)	80,34 (12,88; 122,83)	0,617
АК (10 ³ Ед/мг белка)	119,64 (46,40; 312,62)	226,02 (98,75; 364,41)	0,770
HspB5 (пг/мл)	252,50 (181,50; 297,50)	228,00 (184,00; 275,00)	0,343
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	39,63 (18,33; 63,15)	104,44 (99,24; 319,17)	0,002
КПА (10 ³ Ед/мг белка)	32,60 (12,70; 57,14)	101,62 (87,64; 208,75)	0,009
АК (10 ³ Ед/мг белка)	89,60 (33,12; 108,75)	279,81 (144,25; 349,51)	0,045
HspB5 (пг/мл)	247,00 (197,00; 288,00)	377,00 (255,00; 391,00)	0,034

Примечание – ХПА – химотрипсинподобная активность протеасом, КПА – каспазаподобная активность протеасом, АК – активность кальпаинов.

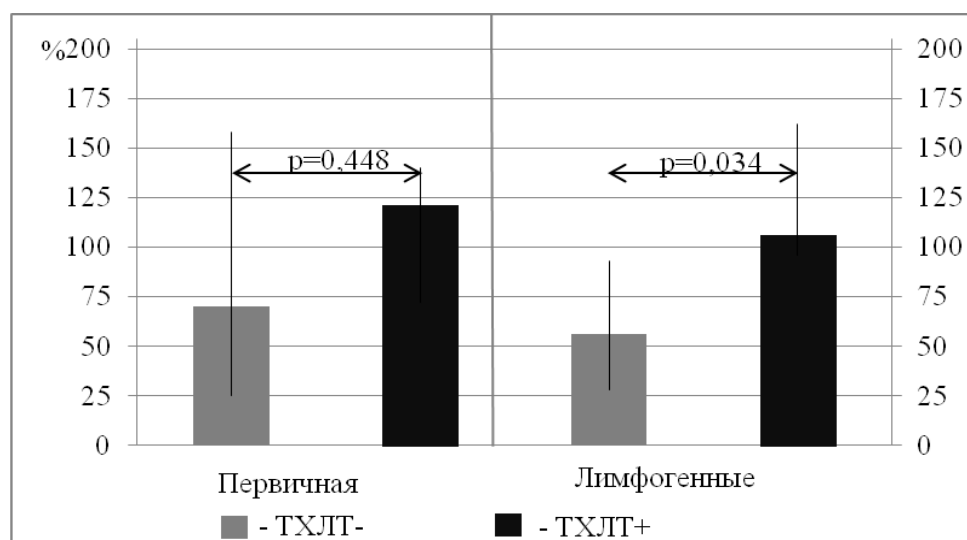


Рисунок 16 – Содержание субъединиц α1α2α3α5α6α7 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов при проведении термохимиолучевой терапии

Таблица 20 – Экспрессия мРНК CAPN1 и CAPN2 в ткани первичной опухоли и лимфогенных метастазов при проведении термохимиолучевой терапии

Показатель	Первичная опухоль		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
CAPN1	4,48 (2,30; 7,93)	4,83 (3,40; 9,65)	0,932
CAPN2	0,30 (0,30; 1,80)	1,03 (0,10; 2,20)	0,083
Показатель	Лимфогенные метастазы		p
	ТХЛТ-	ТХЛТ+	
	n=40	n=20	
CAPN1	1,16 (0,01; 1,40)	1,31 (0,20; 1,80)	0,121
CAPN2	0,50 (0,20; 1,20)	1,05 (1,01; 2,20)	0,427

В отличие от белков теплового шока (которые всегда активизируются в ответ на стресс) протеолитические системы в зависимости от проводимого лечения и локализации злокачественного процесса могут реагировать по-разному. Так, при неoadъювантной химиолучевой терапии пациентов с раком прямой кишки снижалась ХПА, а также содержание тотального пула протеасом и их иммунных субъединиц по сравнению с нелечеными пациентами [1]. При этом в тканях сарком наблюдалось повышение активности протеасом, содержания их иммунных и регуляторных субъединиц при химиотерапии доксорубицином [49]. В связи с этим, авторы предлагают использовать показатели протеасомной и протеолитической систем для оценки прогноза течения раковых заболеваний [1; 49; 153].

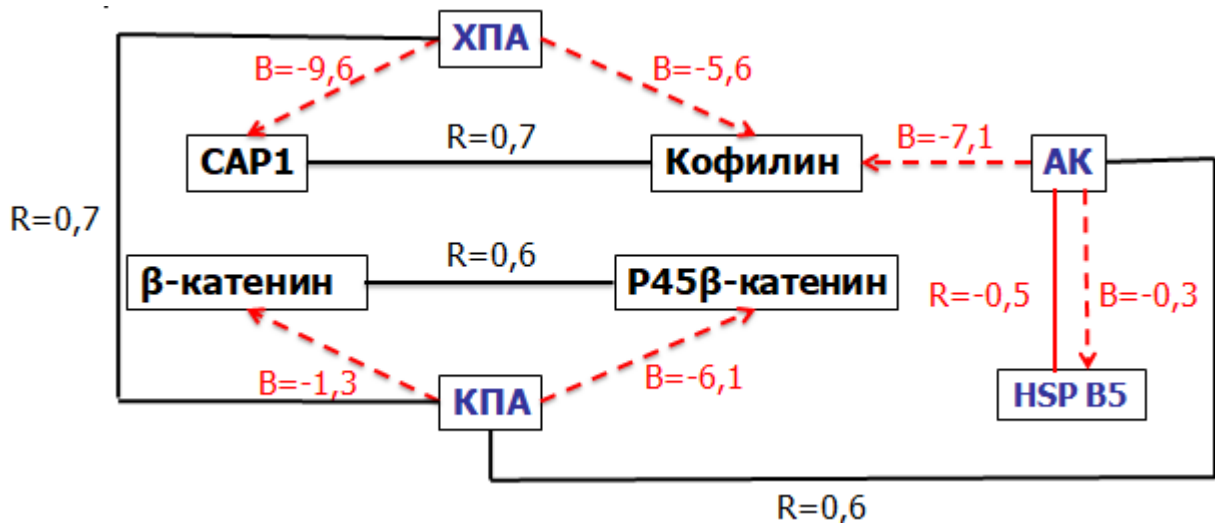
Таким образом, показано изменение ХПА, КПА, АК, уровня субъединиц $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ и HspB5 в ткани лимфогенных метастазов при проведении ТХЛТ. Такие изменения отражают участие системы контроля качества клеточного протеома в стрессовых условиях для опухолевых клеток при ТХЛТ.

3.3 Регуляция белков клеточной подвижности системой контроля качества клеточного протеома

Клетка является целостной саморегулирующейся биологической системой, которая имеет сложные внутренние структурные и функциональные взаимосвязи между своими компонентами и способна поддерживать процессы жизнедеятельности и взаимосвязь с окружающей средой. Опухолевая клетка также сохраняет свою целостность, но приобретает способность к неограниченному росту и делению, а также может терять или приобретать новые регуляторные компоненты. Для более полного представления о внутрисклеточных процессах в опухоли необходимо подробное изучение таких взаимосвязей и регуляций с целью более детального понимания патологического процесса, а также возможностью повлиять на регуляторные пути для лечения онкологических пациентов.

На основании корреляционного анализа и линейной регрессии показаны взаимосвязи и влияния изучаемых белков клеточной подвижности и компонентов системы контроля качества клеточного протеома в ткани НМРЛ (рисунок 17).

Выявлены корреляционные взаимосвязи между показателями системы контроля клеточного протеома: ХПА и КПА протеасом положительно взаимосвязаны между собой ($R=0,7$, $p<0,05$), АК имеет положительную корреляцию с КПА протеасом ($R=0,6$, $p<0,05$), а также отрицательную корреляцию с малым белком теплового шока HspB5 ($R=-0,5$, $p<0,05$); все взаимосвязи имеют среднюю силу.



- Отрицательная корреляционная взаимосвязь
- Положительная корреляционная взаимосвязь
- - -> Влияние одного признака на другой

АБВ Белки клеточной подвижности

АБВ Система контроля качества клеточного протеома

Рисунок 17 – Корреляционные и регрессионные связи компонентов системы контроля качества клеточного протеома и белков клеточной подвижности в ткани первичной опухоли

Примечание – R – коэффициент корреляции Спирмена, B – коэффициент в уравнении линейной регрессии.

Белки клеточной подвижности также работают взаимосвязано: отмечены положительные корреляционные связи между содержанием **КАР1** и **кофилина** ($R=0,5$, $p<0,05$), а также наблюдается достаточно сильная коэкспрессия их генов ($R=0,8$, $p<0,05$); имеются положительные корреляции между общей и фосфорилированной фракцией β -катенина ($R=0,6$, $p<0,05$).

Методом линейной регрессии показано возможное регуляторное влияние белков клеточной подвижности системой контроля клеточного протеома в тканях НМРЛ. Так, в протеолизе фракций β -катенина принимает участие **КАР1** протеасом ($B_{P45\beta\text{-катенин}}=-6,1$, $p<0,05$; $B_{\beta\text{-катенин}}=-1,3$). **ХПА** протеасом деградирует актин-связывающие белки **КАР1** ($B=-9,6$, $p<0,05$) и **кофилин** ($B=-5,6$, $p<0,05$), а **АК**

участвует в деградации кофилина ($B=-7,1$, $p<0,05$), а также оказывает ингибирующее влияние на белок теплового шока HspB5 ($B=-0,3$, $p<0,05$).

Некоторые полученные нами данные имеют созвучные работы и в мировой литературе. На клеточных культурах 293T и HeLa подтверждена деградация протеасомами кофилина после его фосфорилирования [186]. Также показано, что β -катенин такой посттрансляционной модификации как убиквитилирование [179], в связи с чем некоторые авторы также предполагают регуляцию и утилизацию β -катенина протеасомной системой [134; 174; 191]. Кроме того, показано, что HspB5 взаимодействует с кальпаинами для предотвращения деградации белков кальпаинами [37].

В итоге, можно сделать вывод о достаточно тесных взаимодействиях внутри системы контроля качества клеточного протеома и белков клеточной подвижности. Также показано, что протеасомная и кальпаиновая системы ответственны за деградацию белков CAP1, кофилина и β -катенина в опухолевой ткани НМРЛ. Данные результаты исследования могут быть использованы для поиска новых патогенетически обоснованных молекулярных маркеров прогноза течения, выявления риска метастазирования НМРЛ, а также для поиска новых противоопухолевых препаратов.

3.4 Связь белков клеточной подвижности и системы контроля качества клеточного протеома с безрецидивной, безметастатической и общей 2-х летней выживаемостью больных немелкоклеточным раком легкого

Прогнозирование исходов онкологического заболевания является важной задачей в практической онкологии. Склонность к раннему метастазированию НМРЛ во многом определяет его неблагоприятный прогноз. Был проведен анализ прогностической значимости активности протеасом, кальпаинов, уровня белков CAP1, кофилина и β -катенина при НМРЛ с помощью теста Гехана-Вилкоксона и \log рангового критерия для оценки безрецидивной, безметастатической и общей выживаемости. В качестве порогового значения для разделения больных на

подгруппы служили медианы показателей. Показатели выживаемости оценивали с помощью построения кривых выживаемости по методу Каплана-Майера.

Двухлетние результаты прослежены у 35 из 40 пациентов из группы без ТХЛТ и у 20 из 20 пациентов с ТХЛТ. В группе без ТХЛТ живы 28 (80%) пациентов; у 5 (14%) пациентов в течение 2-летнего периода наблюдалось рецидивирование, и у 5 (14%) - прогрессирование процесса в виде развития гематогенных метастазов. В группе с ТХЛТ живы все 20 (100%) пациентов, из них у 2 (10%) наблюдался рецидив и у 1 (5%) – отдаленный метастаз.

Прогностическая значимость изучаемых показателей была оценена для пациентов обеих групп, но достоверные результаты были получены только в отношении группы без ТХЛТ. В таблице 21 представлены результаты однофакторного анализа прогностических параметров у больных НМРЛ без ТХЛТ.

Как следует из таблицы 21, наибольшую информативную ценность для общей выживаемости больных имели показатели активности и содержания протеасом. Проведенный анализ показал, что ХПА выше $41,42 \cdot 10^3$ Ед/мг белка и КПА выше $31,39 \cdot 10^3$ Ед/мг белка в ткани опухоли является неблагоприятным прогностическим признаком 2-летней общей выживаемости (рисунок 18-19).

При изучении прогностической значимости изучаемых показателей в оценке безметастатической выживаемости больных НМРЛ было выявлено, что она зависела от уровня САР1 в ткани опухоли. Лучшая безметастатическая выживаемость наблюдалась при уровне САР1 менее 834,00 пг/мл (рисунок 20).

Таблица 21 - Однофакторный анализ прогностических параметров у больных немелкоклеточным раком легкого без термохимиолучевой терапии

Показатель			Выживаемость, p		
			безрецидивная	безметастатическая	общая
Система контроля качества клеточного протеома	ХПА (10 ³ Ед/мг белка)	Me=41,42	0,078	0,251	0,005
	КПА (10 ³ Ед/мг белка)	Me=31,39	0,552	0,950	0,053
	АК (10 ³ Ед/мг белка)	Me=87,69	0,874	0,429	0,317
	НspB5 (пг/мл)	Me=365,00	0,069	0,631	0,193
	$\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ (% к неизменной ткани)	Me=110,00	0,834	0,142	0,136
	CAPN1	Me=4,48	0,613	0,574	0,088
	CAPN2	Me=0,30	0,678	0,853	0,560
Белки клеточной подвижности	CAP1 (пг/мл)	Me=759,00	0,481	0,017	0,363
	CAP1	Me=3,05			
	Кофилин (% к неизменной ткани)	Me=174,00	0,063	0,293	0,606
	CFL	Me=2,00			
	β -катенин (% к неизменной ткани)	Me=175,00	0,077	0,637	0,432
	P45- β -катенин (% к неизменной ткани)	Me=133,00	0,177	0,318	0,370

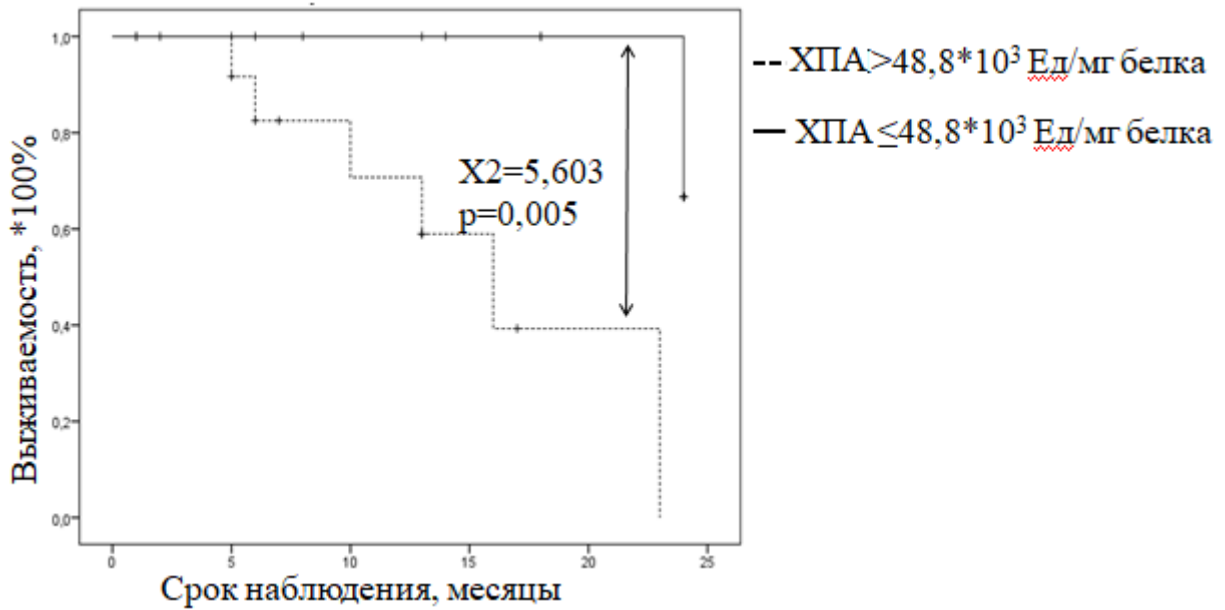


Рисунок 18 – Показатели 2-летней общей выживаемости в зависимости от химотрипсинподобной активности протеасом в тканях первичной опухоли

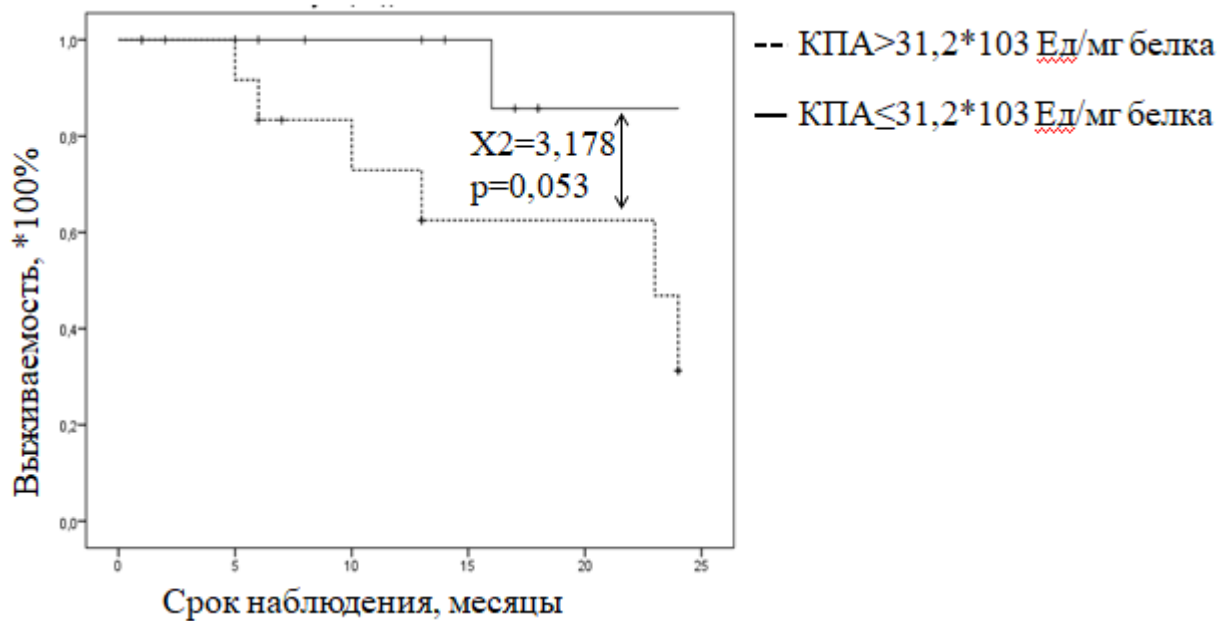


Рисунок 19 – Показатели 2-летней общей выживаемости в зависимости от каспазаподобной активности протеасом в тканях первичной опухоли

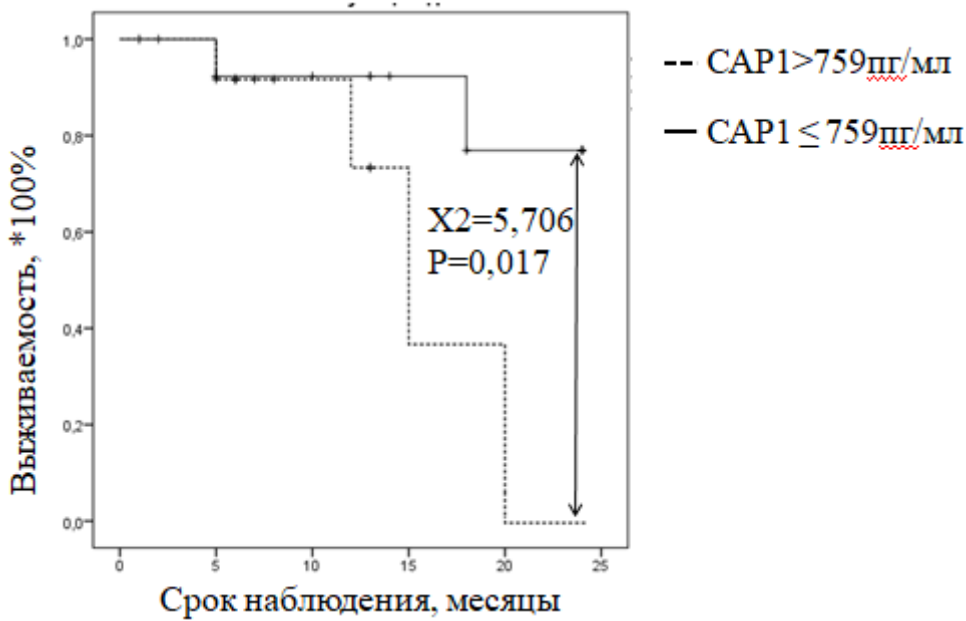


Рисунок 20 – Показатели 2-летней безметастатической выживаемости в зависимости от уровня CAP1 в тканях первичной опухоли

Связь безрецидивной выживаемости больных НМРЛ с пороговыми уровнями изучаемых показателей не обнаружена.

Был оценен вклад CAP1 в развитие отдаленных метастазов, а ХПА и КПА в развитие неблагоприятного исхода при НМРЛ ROC-анализом (рисунок 21). Из рисунка видно, что CAP1 является достаточно сильным предиктором для предсказания риска отдаленного метастазирования для пациентов НМРЛ после операции ($AUC=0,953\pm 0,048$, $p=0,003$, $95\%ДИ=0,859-1,000$; чувствительность 80%, специфичность 96%). ХПА и КПА протеасом являются предикторами средней силы в отношении предсказания неблагоприятного исхода у больных НМРЛ ($AUC=0,734\pm 0,044$, $p=0,037$, $95\%ДИ=0,665-0,983$; чувствительность 80%, специфичность 90% и $AUC=0,755\pm 0,052$, $p=0,005$, $95\%ДИ=0,701-1,000$; чувствительность 83%, специфичность 88%, соответственно).

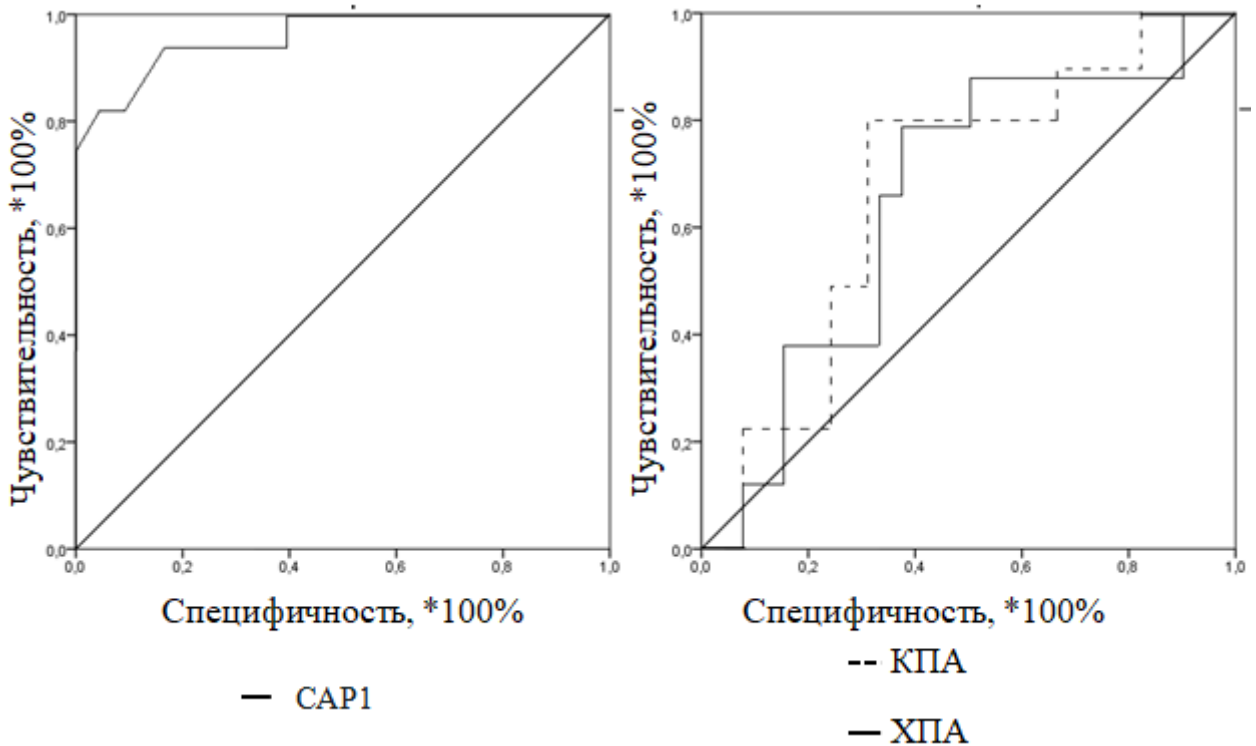


Рисунок 21 – ROC-кривые для определения оценки качества бинарной классификации САР1 в отношении развития отдаленных метастазов и активности протеасом в отношении развития неблагоприятного исхода у больных немелкоклеточным раком легкого

Таким образом, уровни ХПА, КПА протеасом и уровень САР1 являются прогностическими факторами для оценки общей и безметастатической выживаемости больных НМРЛ. Уровень САР1 в ткани первичной опухоли может быть предложен как дополнительный маркер развития отдаленных метастазов, ХПА и КПА протеасом – как дополнительные маркеры неблагоприятного исхода у больных НМРЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак легкого занимает ведущее место по заболеваемости и смертности среди онкологической патологии в России и мире [19; 165]. Высокая агрессивность НМРЛ связана с его быстрым метастазированием, поэтому актуальным является изучение механизмов развития и метастазирования опухолей данной локализации как для понимания закономерностей изменения клеточных процессов при распространении опухолей, так и для разработки методов прогноза метастазирования и подбора тактики лечения.

Значимыми процессами, определяющими метастатический потенциал опухолевых клеток, являются нарушение адгезивных свойств и способность к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которых играет реорганизация актинового цитоскелета [3]. Во многом ответственными за данные процессы в клетке являются актин-связывающие белки, к числу которых относятся CAP1 и кофилин, а также белок, находящийся в комплексе с молекулами межклеточной адгезии – β -катенин. В настоящее время мало представлено работ по изучению данных белков при НМРЛ на клиническом материале; не достаточно изучена возможная регуляция данных белков при метастазировании НМРЛ. За регуляцию белков в клетке отвечает система контроля качества клеточного протеома, включающая белки-шапероны, среди которых мало изученным при НМРЛ является HspB5 (α B-кристаллин), и протеазы, которые представлены главным образом протеасомами и кальпаинами [18; 21]. Эти системы взаимодействуют друг с другом и образуют сеть, обеспечивая полный или частичный протеолиз белков в норме и при патологии [18; 21; 136].

В работе было проведено исследование уровня актин-связывающих белков CAP, кофилина и их мРНК, содержание общей и фосфорилированной фракций β -катенина, показателей протеасомной, кальпаиновой систем, а также уровня HspB5 в опухолевой и неизменной ткани больных НМРЛ. Показана роль данных белков клеточной подвижности и представителей системы контроля клеточного

протеома в прогрессии НМРЛ, а также регуляция CAP1, кофилина и β -катенина протеасомной и кальпаиновой системами в ткани опухоли, что доказывает их участие в развитии и прогрессировании НМРЛ.

При НМРЛ в ткани наблюдается увеличение количества белков клеточной подвижности CAP1, кофилина и β -катенина, а также повышение показателей протеолитических систем в сравнении с неизменной тканью легкого. CAP1 и кофилин являются актиндеполимеризующими белками и играют важную роль в процессах пролиферации, клеточного движения и транспорта, что объясняет их увеличение в опухолях по сравнению с нормальной тканью. Также увеличивается и содержание белка межклеточных контактов β -катенина, для которого доказано активное участие в выживании опухолевых клеток [146; 167]. Таким образом, увеличение белков клеточной подвижности в опухоли по сравнению с неизменной тканью может свидетельствовать не только об инвазии опухолевых клеток, но и об активном делении и процессах выживания. В тоже время в опухоли наблюдается повышение активности протеолитических систем клетки, протеасом и кальпаинов. Вероятно, повышение активности протеасом и кальпаинов при НМРЛ по сравнению с неизменными тканями происходит вследствие возрастающей интенсивности внутриклеточных процессов. Субстраты для этих протеолитических систем многочисленны, среди них: белки-регуляторы клеточного цикла, компоненты системы инсулиноподобных факторов роста, многие транскрипционные факторы, белки pRb и p53, ингибитор NF- κ B I κ B, белки, контролирующие активность каспаз, компоненты сигнальных путей [58], а также различные структурные белки, к числу которых относятся CAP1, кофилин и β -катенин [106].

При анализе связи белков клеточной подвижности и компонентов системы контроля клеточного протеома с гистологическим типом НМРЛ, достоверных отличий выявлено не было. Полученные результаты позволяют предположить, что изучаемые белки являются важным звеном канцерогенеза вне зависимости от пути возникновения опухоли.

Тем не менее, при изменении другого важного клинико-морфологического параметра опухоли – размера первичного очага (Т), изучаемые показатели претерпевали определенные изменения. Отмечалось повышение уровня САР1 и его мРНК в ткани первичной опухоли и ткани лимфогенных метастазов с увеличением ее размера с $T_2N_{0-2}M_0$ до $T_3N_{0-2}M_0$. Уровень мРНК кофилина также увеличивался с ростом опухоли, но уровень белка в той же ткани на стадии $T_3N_{0-2}M_0$ резко снижается в 3 раза по сравнению со стадией $T_2N_{0-2}M_0$. Вполне возможно, что в опухолевой клетке активизируются механизмы посттрансляционной модификации кофилина, которые снижают его уровень. На последних этапах нашей работы, при выяснении взаимосвязей между белками клеточной подвижности и протеолитическими системами как раз и было показано, что кофилин может подвергаться деградации и модуляции ХПА протеасом и активностью кальпаинов. С ростом опухоли и в ткани первичной опухоли, и в ткани лимфогенных метастазов наблюдалось снижение содержания общего β -катенина при двукратном увеличении его фосфорилированной фракции. Полученные результаты отражают современные представления об ЭМП, который происходит при опухолевой инвазии и метастазировании: фосфорилированная фракция β -катенина увеличивается, так как является свидетелем изменения адгезивности клеток [17]. При увеличении распространенности первичного очага также было отмечено ингибирование показателей кальпаиновой системы, а именно ее активности и экспрессии мРНК 1 и 2 кальпаинов. Такое угнетение возможно в опухолях под воздействием оксидативного стресса в связи с окислением цистеина в активном центре кальпаинов [132].

При метастазировании опухоли в регионарные лимфоузлы наблюдались нелинейные изменения изучаемых показателей. При $T_{2-3}N_1M_0$ в ткани первичной опухоли наблюдалось повышение уровня экспрессии мРНК и содержания актин-связывающих белков САР1 и кофилина, а также содержания белка межклеточных контактов β -катенина по сравнению с первичными опухолями $T_{2-3}N_0M_0$; а затем, при $T_{2-3}N_2M_0$ содержание кофилина и фракций β -катенина снижались. Протеосомная же система клетки демонстрировала обратные изменения: при T_2 -

$3N_1M_0$ снижались ХПА и КПА протеасом, а при $T_{2-3}N_2M_0$ активности резко возрастали, при значимом снижении содержания их тотального пула. Общеизвестно, что актин-связывающие белки и белки межклеточных контактов регулируют инвазию и метастазирование в опухолевых клетках, регулируя структуру и функцию актинового цитоскелета, а также влияя на опухолевое микроокружение. Поэтому логично, что лимфогенное метастазирование злокачественных опухолей сопровождается значительными изменениями в работе изучаемых белков клеточной подвижности. Разнонаправленное изменение активности протеасом можно объяснить действием их регуляторных субъединиц Rpt6, Pa28 β [4], которые также могут изменяться в процессе лимфогенного метастазирования [14]. Подобные волнообразные изменения активности протеасом также встречались в тканях рака молочной железы [29].

Несмотря на совершенствование хирургических методов лечения, применение неоадьювантного и адьювантного вариантов лечения все еще существуют большие трудности в значимом улучшении выживаемости при НМРЛ. Эффективность терапии НМРЛ ограничивается лекарственной устойчивостью раковых клеток. Это явление может объясняться различными молекулярно-генетическими механизмами, используемыми опухолевой клеткой. Не исключена роль изучаемых белков в поддержании химиорезистентности опухолевых клеток, поэтому в нашей работе были оценены белки клеточной подвижности и компоненты системы контроля клеточного протеома при проведении ТХЛТ. Все значимые изменения в отношении изучаемых показателей происходили в лимфогенных метастазах. Повышалась общая фракция β -катенина при снижении его фосфорилированной формы в лимфатических узлах при проведении ТХЛТ, что говорит о стабилизации межклеточных контактов и торможении канонического Wnt/ β -катенин-сигнального пути в опухолевом клоне. Кроме того, наблюдалось снижение уровня CAP1 на фоне повышения количества его мРНК при проведении ТХЛТ в лимфогенных метастазах. При этом активность протеасом и кальпаинов в ткани лимфогенных метастазов возрастала в ответ на проведение ТХЛТ. По всей

видимости, в клетках возникает необходимость утилизации разрушенных химиотерапией белков, в связи с чем, активизируются протеолитические системы клетки. Что касается малого белка теплового шока HspB5, то были зарегистрированы его значимые изменения только в ответ на ТХЛТ. Это раскрывает его работу при НМРЛ как истинного белка теплового шока, который в ответ на повреждающий фактор увеличивается в концентрации и функционирует как шаперон.

Учитывая, что объективный клинический ответ на ТХЛТ наблюдался у 90% пациентов, полученные результаты в дальнейшем могут послужить основой для разработки новых критериев для назначения ТХЛТ. К числу кандидатных показателей для предсказания эффективности ТХЛТ можно отнести активность протеасом, активность кальпаинов, содержание в опхолях HspB5, CAP1, кофилина и β -катенина (рисунок 22).

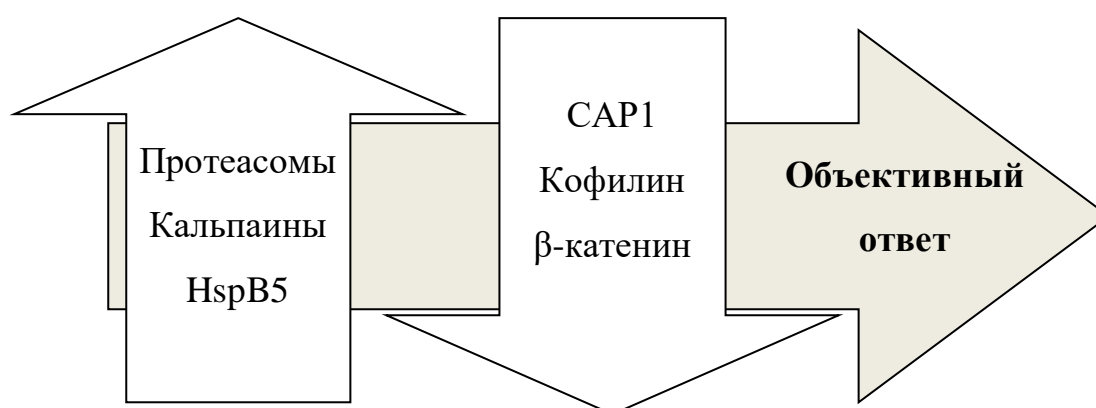


Рисунок 22 – Вклад белков клеточной подвижности и компонентов системы контроля качества клеточного протеома в чувствительность к термохимиолучевой терапии.

Снижение количества CAP1 и фосфорилированного β -катенина возможно за счет его протеасомной деградации в опухолевых клетках после проведенной терапии, что и было показано нами далее. Методами корреляционного анализа и линейной регрессии в данной работе было показано, что ХПА протеасом участвует в деградации CAP1, КПА протеасом – может регулировать содержание β -катенина в клетке.

Прогнозирование исходов онкологического заболевания является важной задачей в практической онкологии. Склонность к раннему метастазированию НМРЛ во многом определяет его неблагоприятный прогноз. Поэтому изучаемые показатели были также изучены в отношении исходов 2-летней общей, безрецидивной и безметастатической выживаемости. Резюмируя полученные данные, уровень САР1 в ткани первичной опухоли может быть предложен как дополнительный маркер развития отдаленных метастазов (чувствительность 80%, специфичность 96%), а ХПА и КПА протеасом – как дополнительные маркеры неблагоприятного исхода у больных НМРЛ после операции (чувствительность 80% и 83% соответственно, специфичность 90% и 88% соответственно).

По итогам проведенного исследования разработана схема, отражающая патогенетическую роль изученных показателей в прогрессировании НМРЛ (рисунок 23).

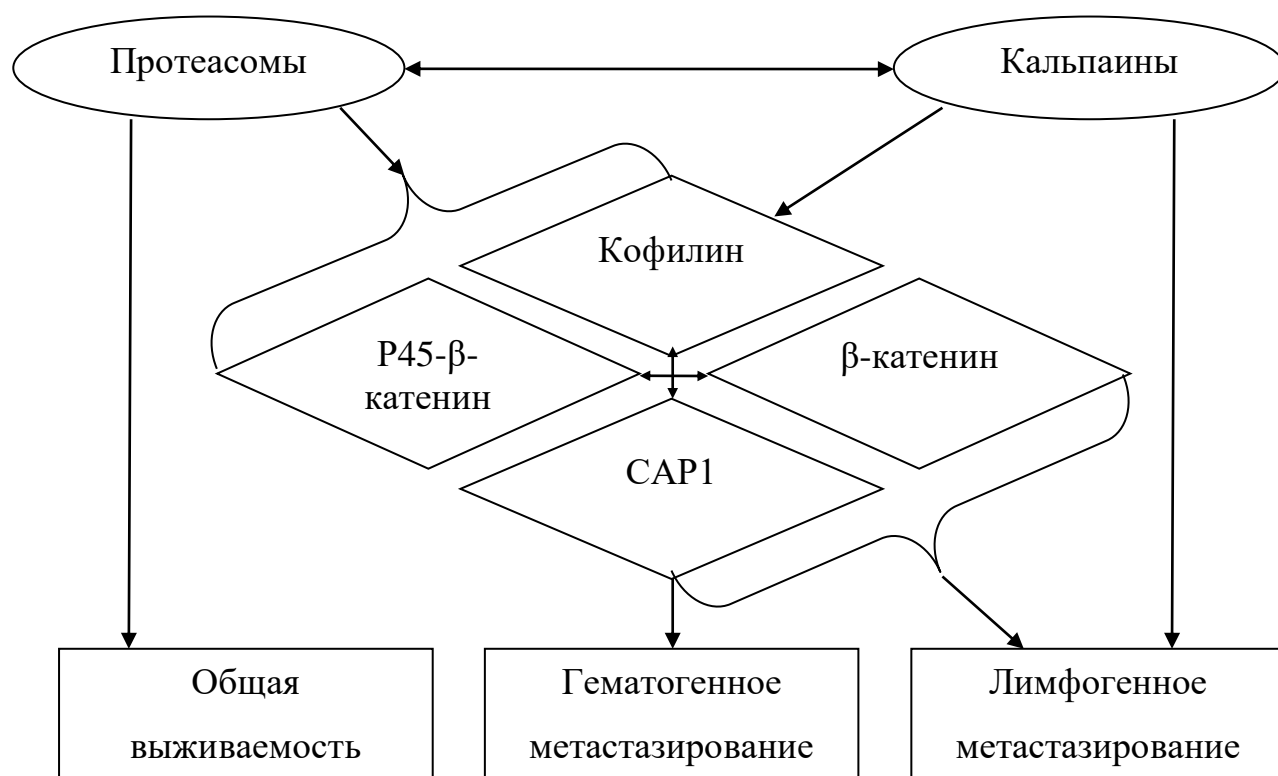


Рисунок 23 – Вклад белков клеточной подвижности и компонентов системы контроля качества клеточного протеома в прогрессирование НМРЛ.

Исходя из совокупности эмпирических знаний и полученных в работе данных, можно утверждать, что белки клеточной подвижности и система контроля качества клеточного протеома играют важную роль в патогенезе НМРЛ, обуславливая его рост и метастазирование. Вовлеченность протеолитических систем в прогрессирование заболевания, по-видимому, связано с регуляцией ими различных белков, в том числе и белков, ассоциированных с клеточной подвижностью, в частности, CAP1, кофилина и фракций β -катенина. Кроме того, CAP1 и активность протеасом оказывают влияние на характер течения и прогноз заболевания, что позволило выделить дополнительные информативные критерии прогноза выживаемости и риска метастазирования у больных НМРЛ.

ВЫВОДЫ

1. В опухолевой ткани НМРЛ выявлено увеличение содержания САР1 в 1,2 раза, кофилина в 1,7 раз, фракций β -катенина в 1,3-1,8 раз, а также активностей протеасом и кальпаинов в 2,2-3,6 раз по сравнению с неизменной тканью легкого ($p < 0,05$).

2. У больных НМРЛ с $T_3N_{0-2}M_0$ отмечается повышение в 1,6 раз содержания САР1 и снижение в 3 раза содержания кофилина при увеличении экспрессии их мРНК в 4,4 и 3,3 раза соответственно в ткани первичной опухоли; повышение в 1,8 раз фосфорилированной фракции β -катенина на фоне снижения в 2,2 раза его общей фракции и снижение активности кальпаинов в 2,5-5,0 раз относительно показателей больных с $T_2N_{0-2}M_0$ ($p < 0,05$).

3. Выявлено повышение уровня САР1 и его мРНК; нелинейное изменение содержания кофилина, экспрессии его мРНК, содержания фракций β -катенина и активности протеасом в опухолевой ткани НМРЛ при поражении регионарных лимфоузлов с уровня $T_{2-3}N_0M_0$ до $T_{2-3}N_2M_0$.

4. Показано, что белки клеточной подвижности и внутриклеточные протеазы подвержены воздействию ТХЛТ в регионарных лимфоузлах: выявлено снижение в 1,4 раза содержания САР1 и в 1,7 раз содержания общей фракции β -катенина на фоне повышения в 2,2 раза содержания его фосфорилированной фракции; протеасомы и кальпаины отвечают повышением своей активности в 2,6-3,1 раз, а малый белок теплового шока HspB5 – увеличением своего количества в 1,5 раза ($p < 0,05$).

5. Обнаружены связи между увеличением химотрипсинподобной активности протеасом и снижением содержания β -катенина; увеличением каспазаподобной активности протеасом и снижением содержания САР1 и кофилина; увеличением активности кальпаинов и снижением содержания кофилина.

6. Высокие химотрипсинподобная (более $48,8 \cdot 10^3$ Ед/мг белка) и каспазаподобная (более $31,2 \cdot 10^3$ Ед/мг белка) активности протеасом являются

неблагоприятным фактором в отношении общей выживаемости; высокий уровень САР1 (более 759,0 пг/мл) является неблагоприятным фактором в отношении отдаленного метастазирования. Данные показатели могут быть использованы в качестве дополнительных критериев оценки прогноза течения немелкоклеточного рака легкого.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

По результатам проведенного исследования у больных НМРЛ целесообразно учитывать уровень САР1 и ХПА и КПА протеасом в ткани опухоли как дополнительные маркеры течения заболевания:

1. При формировании группы повышенного риска развития гематогенных метастазов у больных НМРЛ после операции необходимо учитывать уровень САР1 в ткани опухоли. Значение белка САР1 выше 759 пг/мл нужно считать неблагоприятным фактором в отношении отдаленного метастазирования.

2. При формировании группы повышенного риска неблагоприятного исхода у больных НМРЛ после операции необходимо учитывать ХПА и КПА протеасом в ткани опухоли. Значение ХПА выше $48,8 \cdot 10^3$ Ед/мг белка и КПА выше $31,2 \cdot 10^3$ Ед/мг белка – считать неблагоприятным фактором в отношении развития неблагоприятного исхода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АК – активность кальпаинов
- АТФ - аденозинтрифосфат
- КПА – каспазаподобная активность
- мБТШ – малые белки теплового шока
- мРНК – матричная РНК
- МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход
- НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТХЛТ – термохимиолучевая терапия
- ХПА – химотрипсинподобная активность
- ЭДТА - этилендиамидтетраацетат
- ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
- САР1 – adenylyl cyclase-associated protein 1 (аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1)
- GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа)
- HspB5 – heat shock protein B5 (белок теплового шока B5)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахова, Т.М. Влияние неoadъювантной химиолучевой терапии на пул протеасом рака прямой кишки / Т.М. Астахова, Э.В. Иванова, Г.В. Родоман и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 8. – С. 220-223.
2. Богуш, Т.А. Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого обзор / Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, А.А. Беме и др. // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 12. – С. 1633-1641
3. Бочкарева, Н.В. Роль актинсвязывающих белков в клеточном движении в норме и при опухолевом росте / Н.В. Бочкарева, И.В. Кондакова, Л.А. Коломиец // Молекулярная медицина. – 2011. – № 6. – С.14-18.
4. Бунеева О.А. Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах / О.А. Бунеева, А.Е. Медведев // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64, № 2. – С. 134-148.
5. Волкова, Т.О. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. Экологические аспекты / Т.О. Волкова, У.С. Багина // Принципы экологии. – 2012. – № 2. – С. 4-21.
6. Горбунова, В. А. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого / В.А. Горбунова, Е.В. Артамонова, В.В. Бредер и др. // Злокачественные опухоли: практические рекомендации RUSSCO. – 2017. –Т. 7. – С. 28-42.
7. Заридзе, Д.Г. Канцерогенез / Д.Г. Заридзе // М.: Медицина. – 2004. – 576 с.
8. Иванова, Э.В. Химотрипсинподобная активность протеасом и общая активность кальпаинов при раке желудка и толстой кишки / Э.В. Иванова, И.В. Кондакова, Л.В. Спирина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 6. –С. 753-756.
9. Имянитов, Е.Н. Современные представления о механизмах злокачественной трансформации рака легкого / Е.Н. Имянитов, В.А. Шуткин, Р.В.

Окушко и др. // Вестник Приднестровского университета. Серия: Медико-биологические и химические науки. – 2014. – № 2. – С. 14-26.

10. Исаева, А.В. β -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток / А.В. Исаева, А.П. Зима, И.П. Шабалова и др. // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70, № 4. – С. 475-483.

11. Какурина, Г.В. Особенности протеома сыворотки крови больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи / Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 2. – С. 62-66.

12. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. – 2018. – 250 с.

13. Коваль, В.Д. Активность протеасом и кальпаинов при новообразованиях эндометрия / В.Д. Коваль, Л.В. Спирина, И.В. Кондакова и др. // Молекулярная медицина. – 2012. – № 4. – С. 45-48.

14. Кондакова, И.В. Оценка внеклеточного и внутриклеточного протеолиза при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани / И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Л.В. Спирина и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 45-50.

15. Кондакова, И.В. Химотрипсинподобная активность и субъединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека / И.В. Кондакова, Л.В. Спирина, В.Д. Коваль и др. // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 444-451.

16. Кондакова, И.В. Связь активности внутриклеточных протеиназ с содержанием локомоторных белков в тканях первичных опухолей и метастазах при раке яичников / Кондакова И.В., Юнусова Н.В., Спирина Л.В. и др. // Биоорганическая химия. – 2014. – Т. 40, № 6. – С. 735-741.

17. Крахмаль, Н.В. Инвазия опухолевых эпителиальных клеток: механизмы и проявления / Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова, Е.В. Денисов и др. // Acta Naturae. – 2015. – Т. 2, № 25. – С. 18-31.
18. Мельников, Э.Э. Молекулярные шапероны / Э.Э.Мельников, Т.В. Ротанова // Биоорганическая химия. – 2010. – № 3. – С. 412-419.
19. Одинцова, И.Н. Эпидемиология злокачественных новообразований в мире / И.Н. Одинцова, Л.Ф. Писарева, А.В. Хряпенков // Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 5. – С. 95-101.
20. Переводчикова, Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Н.И. Переводчикова, В.А. Горбунова. – Москва: Практическая медицина. – 2017. – 688 с.
21. Ротанова, Т.В. АТР-зависимые протеиназы и протеолитические комплексы внутриклеточной деградации белков / Т.В. Ротанова, Э.Э. Мельников // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 512-530.
22. Спирина, Л.В. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе / Л.В. Спирина, И.В. Кондакова // Вопросы онкологии. 2008. – Т. 54, № 6. – С. 690-694.
23. Спирина, Л.В. Активность протеасом и их субъединичный состав в ткани рака эндометрия: связь с клинико-морфологическими параметрами / Л.В. Спирина, И.В. Кондакова, В.Д. Коваль и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 4. – С. 491-494.
24. Спирина, Л.В. Экспрессия транскрипционных факторов, сосудистого эндотелиального фактора роста и активность внутриклеточных протеиназ у больных с локализованным и диссеминированным раком почки / Л.В. Спирина, Е.А. Усынин, И.В. Кондакова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 4. – С. 31-38.
25. Татарский, В.В. Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования / В.В. Татарский // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – Т. 3, №1. – С. 28-31.

26. Трахтенберг, А. Х. Рак легкого / А. Х. Трахтенберг, К. И. Колбанов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 160 с.
27. Цимоха, А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах / А.С. Цимоха // Цитология. – 2010. – Т. 52, № 4. – С. 277-300.
28. Шарова, Н.П. Диагностика рака щитовидной железы: ограничения существующих методов и перспективы будущих разработок / Н.П. Шарова, И.Р. Сумеди, Т.М. Астахова // Известия РАН. Серия: биология. – 2014. – №4. – С. 348-354.
29. Шашова, Е.Е. Изменение активности протеасом и кальпаинов при метастазировании рака легкого и рака молочной железы человека Е.Е. Шашова, Е.С. Колегова, А.А. Завьялов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 4. – С. 486-489.
30. Шуткин, В.А. Наследственная теория рака легкого / В.А. Шуткин, Е.Н. Имянитов, В.Г.Стратан и др. // Вестник Приднестровского университета. Серия: Медико-биологические и химические науки. – 2017. – Т. 2, № 2. – С. 3-12.
31. Abe K. NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression / K. Abe, M. Takeichi // Neuron. – 2007. – Vol. 53(3). – P. 387-397.
32. Adhikari A.S. α B-crystallin, a small heat shock protein, modulates NF- κ B activity in a phosphorylation-dependent manner and protects muscle myoblasts from TNF- α induced cytotoxicity / A.S. Adhikari, B.N.Singh, S.K. Rao [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1813. – P. 1532-1542.
33. Albain K.S. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial / K.S. Albain, R.S. Swann, V.W. Rusch // Lancet. – 2009. – Vol. 1(374). – P. 379-386.
34. Ali M. Alternative Expression and Localization of Profilin 1/VASPP157 and Cofilin 1/VASPP239 Regulates Metastatic Growth and Is Modified by DHA Supplementation / M. Ali, K. Heyob, N.K. Jacob [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2016. – Vol. 15(9). – P. 2220-2231.

35. Arrigo A.P. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets / A.P. Arrigo, S. Simon, B. Gibert [et al.] // *FEBS Lett.* – 2007. – Vol. 581(19). – P. 3665-3674.
36. Atencio I. Calpain Inhibitor 1 Activates p53-dependent Apoptosis in Tumor Cell Lines / I. Atencio, M. Ramachandra, P. Shabram [et al.] // *Cell Growth Differ.* – 2000. – Vol. 11(5). – P. 247-253.
37. Bakthisaran R. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology / R. Bakthisaran, R. Tangirala, C.M. Rao // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1854(4). – P. 291-319.
38. Baritaki S. Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by the novel proteasome inhibitor, NPI-0052 : pivotal roles of Snail repression and RKIP induction / S. Baritaki, A. Chapman, K. Yeung [et al.] // *Oncogene.* – 2009. – Vol. 28(40). – P. 3573-3585.
39. Bassermann F. The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer / F. Bassermann, R. Eichner, M. Pagano // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1843(1). – P. 150-162.
40. Becker M. High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas / M. Becker, M.A. De Bastiani, C.B. Müller [et al.] // *Tumor Biol.* – 2014. – Vol. 35(2). – P. 1233-1238.
41. Ben-Shahar S. 26S Proteasome-mediated Production of an Authentic Major Histocompatibility Class I-restricted Epitope from an Intact Protein Substrate / S. Ben-Shahar, A. Komlosch , E. Nadav [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274(31). – P. 2196-2197.
42. Benetti R. The calpain system is involved in the constitutive regulation of beta-catenin signaling functions / R. Benetti, T. Copetti, S. Dell'Orso [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280(23). – P. 22070-22080.
43. Bertling E. Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells / E. Bertling, P. Hotulainen, P.K. Mattila [et al.] // *Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 15. – P. 2324-2334.

44. Blechschmidt K. The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas / K. Blechschmidt, E. Kremmer, R. Hollweck [et al.] // *Diagn. Mol. Pathol.* – 2007. – Vol. 16(4). – P. 222-228.
45. Brieher W. Mechanisms of actin disassembly / W. Brieher // *Mol. Biol. Cell.* – 2013. – Vol. 24(15). – P. 2299-2302.
46. Campbell-Lloyd A.J. Is alpha-B crystallin an independent marker for prognosis in lung cancer? / A.J. Campbell-Lloyd, J. Mundy, R. Deva [et al.] // *Heart Lung Circ.* – 2013. – Vol. 22(9). – P. 759-766.
47. Carragher N.O. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions / N.O. Carragher, B.D. Fonseca, M.C. Frame // *Neoplasia.* – 2004. – Vol. 6. – P. 53-73.
48. Castro M.A. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer / M.A. Castro, F. Dal-Pizzol, S. Zdanov [et al.] // *Cancer.* – 2010. – Vol. 116(15). – P. 3645-3655.
49. Cerruti F. Proteasomes are not a target for doxorubicin in feline injection-site sarcoma / F. Cerruti, M. Martano, E. Morello [et al.] // *J. Comp. Pathol.* – 2010. – Vol. 143(2-3). – P. 164-172.
50. Chattopadhyay N. KRAS Genotype Correlates with Proteasome Inhibitor Ixazomib Activity in Preclinical In Vivo Models of Colon and Non-Small Cell Lung Cancer: Potential Role of Tumor Metabolism / N. Chattopadhyay, A.J. Berger, E. Koenig [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10(12). – P. e0144825.
51. Cherneva R. Expression profile of the small heat-shock protein alpha-B-crystallin in operated-on non-small-cell lung cancer patients: clinical implication / R. Cherneva, D. Petrov, O. Georgiev [et al.] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2010. – Vol. 37(1). – P. 44-50.
52. Christiansen J.J. Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis / J.J. Christiansen, A.K. Rajasekaran // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 8319.

53. Cron K.R. Proteasome inhibitors block DNA repair and radiosensitize non-small cell lung cancer / K.R. Cron, K. Zhu, D.S. Kushwaha [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(9). – P. e73710.
54. Cortesio C.L. Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration / C.L. Cortesio, L.R. Boateng, T.M. Piazza [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286(12). – P. 9998-10006.
55. Daly B.D. Role of surgery following induction therapy for stage III non-small cell lung cancer / B.D. Daly, R.J. Cerfolio, M.J. Krasna // Surg. Oncol. Clin. N. Am. – 2011. – Vol. 20(4). – P. 721-732.
56. Delmas C. MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export / C. Delmas, N. Aragou, S. Poussard [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278(14). – P. 12443-12451.
57. Dolcet X. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants / X. Dolcet, D. Llobet, M. Encinas [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 22118-22130.
58. Driscoll J.J. The ubiquitin-proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies / J.J. Driscoll, A. Minter, D.A. Driscoll [et al.] // Anticancer Agents Med. Chem. – 2011. – Vol. 11(2). – P. 242-246.
59. Ebstein F. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing / F. Ebstein // Cell Mol. Life Sci. – 2012. – Vol. 69. – P. 43-58.
60. Field J. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method / J. Field, J. Nikawa, D. Broek [et al.] // Mol. Cell Biol. – 1988. – Vol. 8. – P. 2159-2165.
61. Fischer J.R. Validation of molecular and immunological factors with predictive importance in lung cancer / J.R. Fischer, H. Lahm // Lung Cancer. – 2004. – Vol. 45(2). – P. S151-S161.
62. Fossella F. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-smallcell

lung cancer: the TAX 326 study group / F. Fossella, J.R.Pereira, J. von Pawel [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 3016-3024.

63. Friedl P. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity / P. Friedl, S. Alexander // *Cell.* – 2011. – Vol. 147(5). – P. 992-1009.

64. Ganti A.K. Hormone replacement therapy is associated with decreased survival in women with lung cancer / A.K. Ganti, A.E. Sahmoun, A.W. Panwalkar [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24(1). – P. 59-63.

65. Geng Y. Sulforaphane Induced Apoptosis via Promotion of Mitochondrial Fusion and ERK1/2-Mediated 26S Proteasome Degradation of Novel Pro-survival Bim and Upregulation of Bax in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells / Y. Geng, Y. Zhou, S. Wu [et al.] // *J. Cancer.* – 2017. – Vol. 8(13). – P. 2456-2470.

66. Glasgow E. Transforming growth factor-beta signaling and ubiquitinators in cancer / E. Glasgow // *Endocrine-Related Cancer.* – 2008. – Vol. 15. – P. 59-72.

67. Gokhin D.S. Calpain-mediated proteolysis of tropomodulin isoforms leads to thin filament elongation in dystrophic skeletal muscle / D.S. Gokhin, M.T. Tierney, Z. Sui et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2014. – Vol. 25(6). – P. 852-865.

68. Goll D.E. The calpain system / D.E. Goll, V.F. Thompson, H. Li [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83(3). – P. 731-801.

69. Gong J. Huo F-box proteins involved in cancer-associated drug resistance (Review) / J. Gong, Y. Zhou, D. Liu [et al.] // *Onc. Lett.* – 2018. – Vol. 15. – P. 8891-8900.

70. Goodrich L.V. Principles of planar polarity in animal development / L.V. Goodrich, D. Strutt // *Development.* – 2011. – Vol. 138(10). – P. 1877-1892.

71. Gu J. Capn4 promotes non-small cell lung cancer progression via upregulation of matrix metalloproteinase 2 / J. Gu, F.K. Xu, G.Y. Zhao [et al.] // *Med Oncol.* – 2015. – Vol. 32(3). – P. 51.

72. Han H.J. Estradiol-17beta stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes / H.J. Han, J.S. Heo, Y.J. Lee // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 290(4). – P. 1067-1075.

73. Hanna R.A. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin / R.A. Hanna, R.L. Campbell, P.L. Davies // *Nature*. –2008. – Vol. 456. – P. 409-412.

74. Heuzé M.L. ASB2 targets filamins A and B to proteasomal degradation / M.L. Heuzé, I. Lamsoul, M. Baldassare [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112(13). – P. 5130-5140.

75. Ho W.C. Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma / W.C. Ho, L. Pikor, Y. Gao [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287(19). – P. 15458-15465.

76. Hou J. 17-beta-estradiol induces both up-regulation and processing of cyclin E in a calpain-dependent manner in MCF-7 breast cancer cells / J. Hou, X. Wang, Y. Li [et al.] // *FEBS Letters*. – 2012. – Vol. 586(6). – P. 892-896.

77. Hu R. AlphaB-crystallin is mutant B-RAF regulated and contributes to cyclin D1 turnover in melanocytic cells / R. Hu, A.E. Aplin // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2010. – Vol. 23(2). – P. 201-209.

78. Hua M. CAP1 is overexpressed in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation / M. Hua, S. Yan, Y. Deng [et al.] // *Int. J. of Mol. Med.* – 2015. – Vol. 35. P. 941-949.

79. Huang C. Wnt2 promotes non-small cell lung cancer progression by activating WNT/ β -catenin pathway / C. Huang, R. Ma, Y. Xu [et al.] // *Am. J. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 5(3). – P. 1032-1046

80. Huang C.L. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer / C.L. Huang, D. Liu, S. Ishikawa [et al.] // *Eur. J. Cancer*. – 2008. – Vol. 44(17). – P. 2680-2688.

81. Huang Q. Negative regulation of 26S proteasome stability via calpain-mediated cleavage of Rpn10 subunit upon mitochondrial dysfunction in neurons / Q. Huang, H. Wang, S.W. Perry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288(17). – P. 12161-12174.

82. Huang Z. Tumor suppressor Alpha B-crystallin (CRYAB) associates with the cadherin/catenin adherens junction and impairs NPC progression-associated

properties / Z. Huang, Y. Cheng, P.M. Chiu [et al.] // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31(32). – P. 3709-3720.

83. Hung R.J. CYP1 A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian nonsmokers: a pooled analysis / R.J. Hung, H. Boffetta, J. Brockmoller [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2003. – Vol. 24. – P. 875-882.

84. Ichetovkin I. Actin filaments are severed by both native and recombinant dictyostelium cofilin but to different extents / I. Ichetovkin, J. Han, K.M. Pang [et al.] // *Cell Motil. Cytoskeleton*. – 2000. – Vol. 45(4). – P. 293-306.

85. Imyanitov E.N. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles / E.N. Imyanitov, A.V. Togo, K.P. Hanson // *Cancer Lett.* – 2004. – Vol. 204. – P. 3-14.

86. Jeong W.J. Cytoplasmic and nuclear anti-apoptotic roles of α B-crystallin in retinal pigment epithelial cells / W.J. Jeong, J.H. Rho, Y.G. Yoon [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(9). – P. e45754.

87. Johnson D.H. Thoracic radiotherapy does not prolong survival in patients with locally advanced, unresectable non-small cell lung cancer / D.H. Johnson, L.H. Einhorn, A. Bartolucci et al. // *Annals Int. Med.* – 1990. – Vol. 113. – P. 33-38.

88. Jung T. Structure of the proteasome / T. Jung // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2012. – Vol. 109. – P. 1-39.

89. Kakumu T. Identification of proteasomal catalytic subunit PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer / T. Kakumu, M. Sato, D. Goto [et al.] // *Cancer Sci.* – 2017. – Vol. 108(4). – P. 732-743.

90. Kampinga H.H. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins / H.H. Kampinga, J. Hageman, M.J. Vos [et al.] // *Cell Stress and Chaperones*. – 2009. – Vol. 14. – P. 105-111.

91. Kang C.G. Rho-associated kinase signaling is required for osteopontin-induced cell invasion through inactivating cofilin in human non-small cell lung cancer cell lines / C.G. Kang, H.J. Han, H.J. Lee [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 25(9). – P. 1956-1960.

92. Kase S. AlphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF / S. Kase, S. He, S. Sonoda // *Blood*. – 2010. – Vol. 115(16). – P. 3398-3406.
93. Kathy S. Radiotherapy plus Chemotherapy with or without Surgical Resection for Stage III Non-Small Cell Lung Cancer / S. Kathy, M.D. Albain, R. Suzanne Swann [et al.] // *Lancet*. – 2009. – Vol. 374(9687). – P. 379-386.
94. Keshamouni V.G. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis: a method to the madness / V.G. Keshamouni, W.P. Schieman // *Future Oncol*. – 2009. – Vol. 5(8). – P. 1109-1111.
95. Kim I.U. Antitumor Effect of Calcium-Mediated Destabilization of Epithelial Growth Factor Receptor on Non-Small Cell Lung Carcinoma / I.U. Kim, I.S. Sung, J.J. Sim // *Int. J. Mol. Sci*. – 2018. – Vol. 19(4). – P. e1158.
96. Kim J.C. Gene expression profiling: Canonical molecular changes and clinicopathological features in sporadic colorectal cancers / J.C. Kim, S.Y. Kim, S.A. Roh [et al.] // *World J. Gastroenterol*. – 2008. – Vol. 14. P. 6662-6672.
97. Kimelman D. b-Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective / D. Kimelman, W. Xu // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – P. 7482-7491.
98. Kisselev A.F. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown / A.F. Kisselev, T.N. Akopian, V. Castillo [et al.] // *Mol. Cell*. – 1999. – Vol. 4(3). – P. 395-402.
99. Kohn A.D. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways / A.D. Kohn, R.T. Moon // *Cell Calcium*. – 2005. – Vol. 38(3-4). – P. 439-446.
100. Kondakova I.V. Chymotrypsin-like activity and subunit composition of proteasomes in human cancers / I.V. Kondakova, L.V. Spirina, V.D. Koval [et al.] // *Mol. Biol*. – 2014. – Vol. 48(3). – P. 444-451.
101. Lakshmikuttyamma A. Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas / A. Lakshmikuttyamma, P. Selvakumar, R. Kanthan [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. – 2004. – Vol. 13(10). – P. 1604-1609.

102. Lambrechts A. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility / A. Lambrechts, M. Van Troys, C. Ampe // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36 (10). – P. 1890-1909.
103. Lappalainen P. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo / P. Lappalainen, D.G. Drubin // *Nature.* – 1997. – Vol. 388(6637). – P. 77-82.
104. Larsen A.K. Genetic disruption of calpain correlates with loss of membrane blebbing and differential expression of RhoGDI-1, cofilin and tropomyosin / A.K. Larsen, R. Lametsch, J. Elce [et al.] // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 411(3). – P. 657-666.
105. Lazzari C. Combination of immunotherapy with chemotherapy and radiotherapy in lung cancer: is this the beginning of the end for cancer? / C. Lazzari, N. Karachaliou, A. Bulotta [et al.] // *Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2018. – Vol. 10. – P. 1-12.
106. Le Dévédec S.E. Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis / S.E. Le Dévédec, K. Yan, H. de Bont [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67(19). – P. 3219-3240.
107. Leloup L. Calpains as potential anti-cancer targets / L. Leloup, A. Wells // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2011. – Vol. 15. – P. 309-323.
108. Li C. Proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) induces calpain-dependent I κ B(α) degradation / C. Li, S. Chen, P. Yue [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285(21). – P. 16096-16104.
109. Li D. The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells / D. Li, H. Wang, H. Song [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(49). – P.85276-85289.
110. Li M. Downregulated expression of the cyclase-associated protein 1 (CAP1) reduces migration in esophageal squamous cell carcinoma / M. Li, X. Yang, H. Shi [et al.] // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 43(9). – P. 856-864.
111. Liu K. Altered ubiquitin causes perturbed calcium homeostasis, hyperactivation of calpain, dysregulated differentiation, and cataract / K. Liu, L. Lyu, D. Chin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol. 112(4). – P. 1071-1076.

112. Liu L. Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis / L. Liu, D. Xing, W.R. Chen // *Int. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 125(12). – P. 2757-2766.
113. Liu X. High expression and prognostic role of CAP1 and CtBP2 in breast carcinoma: associated with E-cadherin and cell proliferation / X. Liu, N. Yao, J. Qian [et al.] // *Med. Oncol.* – 2014. – Vol. 31(3). – P. 878.
114. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
115. Ma P.C. Functional expression and mutation of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non- small cell lung cancer / P.C. Ma, R. Jagadeeswaran, S. Jagadeesh [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 1479-1488.
116. Macqueen D.J. Characterization of the definitive classical calpain family of vertebrates using phylogenetic, evolutionary and expression analyses / D.J. Macqueen, A.H. Wilcox // *Open Biol.* – 2014. – Vol. 4(130219). – P. 1-11.
117. Makkonen M. Mammalian and malaria parasite cyclase-associated proteins catalyze nucleotideexchange on G-actin through a conserved mechanism / M. Makkonen, E. Bertling, N.A. Chebotareva [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288. – P. 984-994.
118. May-Simera H.L. Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton / H.L. May-Simera, M.W. Kelley // *Cilia.* – 2012. – Vol. 1(7).
119. Miller K.D. Cancer treatment and survivorship statistics / K.D. Miller, R.L. Siegel, C.C. Lin [et al.] // *CA. Cancer J. Clin.* – 2016. – Vol. 66, №4. – P. 271-289.
120. Morin P.J. b-catenin signaling and cancer / P.J. Morin // *BioEssays.* –1999. – Vol. 21. – P. 1021-1030.
121. Meulmeester E. The dynamic roles of TGF- β in cancer / E. Meulmeester, P. ten Dijke // *The J. of Pathology.* – 2011. – Vol. 223(2). – P. 206-219.
122. Müller C.B. Validation of cofilin-1 as a biomarker in non-small cell lung cancer: application of quantitative method in a retrospective cohort / C.B. Müller, R.L.

de Barros, M.A. Castro [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 137(9). – P. 1309-1316.

123. Nakajima T. Involvement of calpain 2 in ionomycin-induced cell death in cultured mouse lens epithelial cells / T. Nakajima, T.R. Shearer, M. Azuma // *Curr. Eye Res.* – 2011. – Vol. 36(10). – P. 930-936.

124. Ni X.-G. The ubiquitin-proteasome pathway mediates gelsolin protein downregulation in Pancreatic Cancer / X.-G. Ni, L. Zhou, G.-Q. Wang [et al.] // *Mol Med.* – 2008– Vol. 14. – P. 582-589.

125. Peche V. CAP2, cyclase-associated protein 2, is a dual compartment protein / V. Peche, S. Shekar, M. Leichter [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2007. – Vol.64. – P. 2702-2715.

126. Peng X.C. Comparative proteomic approach identifies PKM2 and cofilin-1 as potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets for pulmonary adenocarcinoma / X.C. Peng, F.M. Gong, Y.W. Zhao [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(11). – P. e27309.

127. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. / M. W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29 (9). – P. 45-51.

128. Pi J. Elevated Expression of miR302-367 in Endothelial Cells Inhibits Developmental Angiogenesis via CDC42/CCND1 Mediated Signaling Pathways / J. Pi, J. Liu, T. Zhuang [et al.] // *Theranostics.* – 2018. – Vol. 8(6). – P. 1511-1526.

129. Polakis P. Wnt signaling and cancer / P. Polakis // *Genes Dev.* – 2000. – Vol. 14. – P. 1837-1851.

130. Postmus, P. E. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / P. E. Postmus, K. M. Kerr, M. Oudkerk et al. // *Ann. Oncol.* – 2017. – Vol. 28, Suppl. 4. – P. iv1-iv21.

131. Qin H. Elevated expression of CRYAB predicts unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer / H. Qin, Y. Ni, J. Tong [et al.] // *Med. Oncol.* – 2014. – Vol. 31(8). – P. 142.

132. Raimbourg Q. The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma / Q. Raimbourg, J. Perez, S. Vandermeersch [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(4). – P. e60469.

133. Rawlings N.D. MEROPS: the peptidase database / N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 38. – P. 227-233.

134. Ray M. Beta catenin is degraded by both caspase-3 and proteasomal activity during resveratrol-induced apoptosis in HeLa cells in a GSK3 β -independent manner / M. Ray, N. Rai, K. Jana [et al.] // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2015. – Vol. 52(1). – P. 7-13.

135. Reck M. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL / M. Reck, J. von Pawel, P. Zatloukal [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1227-1234.

136. Rothberg J.M. Live-cell imaging of tumor proteolysis: Impact of cellular and non-cellular microenvironment / J.M. Rothberg, M. Sameni, K. Moin [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1824. – P. 123-132.

137. Said A.H. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer / A.H. Said, J-P. Raufman, G. Xie // *Cancers*. – 2014. – Vol. 6(1). – P. 366-375.

138. Sandmann S. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 / S. Sandmann, F. Prenzel, L. Shaw [et al.] // *Br. O. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 135(8). – P. 1951-1958.

139. Schiller J.H. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer / J.H. Schiller, D. Harrington, C.P. Belani [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 346. – P. 92-98.

140. Seeger H. Is there a protective role of progestogens on the proliferation of human ovarian cancer cells in the presence of growth factors? / H. Seeger, D. Wallwiener // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* – 2006. – Vol. 27(2). – P. 139-141.

141. Shagieva G.S. Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells / G.S. Shagieva, L.V.

Domnina, T.A. Chipysheva [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2012. – Vol. 77. – P. 1266-1276.

142. Sharova N. Multiple forms of proteasomes and their role in tumor fate / N. Sharova, L. Zakharova // *Rec. Patents on Endocr., Metab. & Imm. Drug Disc.* – 2008. – Vol. 2(3). – P. 152-161.

143. Shashova E.E. Proteasome Functioning in Breast Cancer: Connection with Clinical-Pathological Factors / E.E. Shashova, Yu.V. Lyupina, S.A. Glushchenko [et al.] // *Plos One*. – 2014. – Vol. 9(10). – P. e109933.

144. Shepherd F. The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer / F. Shepherd, J. Crowley, P. Van Houtte [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2007. – Vol. 2. – P. 1067-1077.

145. Shigematsu H. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancers / H. Shigematsu, L. Lin, T. Takahashi [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97. – P. 339-346.

146. Shivanna S. The c-Cbl ubiquitin ligase regulates nuclear β -catenin and angiogenesis by its tyrosine phosphorylation mediated through the Wnt signaling pathway / S. Shivanna, I. Harrold, M. Shashar [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290(20). – P. 12537-12546.

147. Silver K. Suppression of calpain expression by NSAIDs is associated with inhibition of cell migration in rat duodenum / K. Silver, A. Littlejohn, L. Thomas [et al.] // *Toxicology*. – 2017. – Vol. 383. – P. 1-12.

148. Smith I.J. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle / I.J. Smith, S.L. Dodd // *Exp. Physiol.* – 2007. – Vol. 92(3). – P. 561-573.

149. Sobin L.H. *TNM Classification of Malignant Tumours* / ed. by L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz and Ch. Wittekind // *International Union Against Cancer (UICC)*. – 7th Edition. – 2009. – 309 p.

150. Sorimachi H. Calpain chronicle an enzyme family under multidisciplinary characterization / H. Sorimachi, S. Hata, Y. Ono // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* – 2011. – Vol. 87(6). – P. 287-327.
151. Stadtmueller B.M. Proteasome activator / B.M. Stadtmueller // *Mol. Cell.* – 2011. – Vol. 41. – P. 8-19.
152. Storr S.J. The calpain system and cancer / S.J. Storr, N.O. Carragher, M.C. Frame [et al.] // *Nature Reviews Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 364-374.
153. Storr S.J. Calpain-2 expression is associated with response to platinum based chemotherapy, progression-free and overall survival in ovarian cancer / S.J. Storr, S. Safuan, C.M. Woolston [et al.] // *J. Cell Mol. Med.* – 2012. – Vol. 16(10). – P. 2422-2428.
154. Su Y. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis / Y. Su, Z. Cui, Z. Li [et al.] // *ASEB J.* – 2006. – Vol. 20(9). – P. 1443-1451.
155. Suzuki K. Structure, activation, and biology of calpain / K. Suzuki S. Hata, Y. Kawabata [et al.] // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53(1). – P. 12-18.
156. Swiston J. Differential expression of CAP and CAP2 in adult-rat tissues / J. Swiston, A. Hubberstey, G. Yu [et al.] // *Gene.* – 1995. – Vol. 165. – P. 273-277.
157. Tan M. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 is associated with metastasis of lung cancer / M. Tan, X. Song, G. Zhang [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol. 30(4). – P. 1639-1644.
158. Tan Y. Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli / Y. Tan, C. Wu, T. De Veyra [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 17689-17698.
159. Tan Y. MicroRNA-138 inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by targeting LIMK1 / Tan Y., Hu H., Tan W. [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2016. – Vol. 14(5). – P. 4422-4428.
160. Tang Y.N. Epigenetic regulation of Smad2 and Smad3 by profilin-2 promotes lung cancer growth and metastasis / Y.N. Tang, W.Q. Ding, X.J. Guo [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. – Vol. 6. – P. 8230.

161. Taylor R.P. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals / R.P. Taylor, I.J. Benjamin // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2005. – Vol. 38(3). – P. 433-444.
162. Thibout Y. Is pneumonectomy after induction chemotherapy for non-small cell lung cancer a reasonable procedure? A multicenter retrospective study of 228 cases. / Y. Thibout, B. Guibert, N. Bossard [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2009. – Vol. 4(12). – P. 1496-1503.
163. Tian X. MicroRNA-429 inhibits the migration and invasion of colon cancer cells by targeting PAK6/cofilin signaling / X. Tian, Z. Wei, J. Wang [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 34(2). – P. 707-714.
164. Tompa P. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain / P. Tompa, Y. Emori, H. Sorimachi [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 280. – P. 1333-1339.
165. Torre L.A. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update / L.A. Torre, R.L. Siegel, E.M. Ward [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2016. – Vol. 25. – P. 16-27.
166. Travis W.D. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart / ed. by W.D. Travis, E. Brambilla, H.K. Muller-Hermelink, C. Harris [et al.] // Geneva: IARC Press. – 2004. – 289 p.
167. Valenta T. The many faces and functions of b-catenin / T. Valenta, G. Hausmann, K. Basler // *EMBO J.* – 2012. – Vol. 31. – P. 2714-2736.
168. van Amerongen R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development / R. van Amerongen, R. Nusse // *Development.* – 2009. – Vol. 136(19). – P. 3205-3214.
169. van de Schootbrugge C. α B-crystallin stimulates VEGF secretion and tumor cell migration and correlates with enhanced distant metastasis in head and neck squamous cell carcinoma / C. van de Schootbrugge, J. Bussink, P.N. Span [et al.] // *BMC Cancer.* – 2013. – Vol. 13. – P. 128-135.

170. van Kasteren S.I. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules / S.I. van Kasteren, H. Overkleeft, H. Ovaa [et al.] // *Curr. Opin. Immunol.* – 2014. – Vol. 26. – P. 21-31.
171. Vermeulen L. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment / L. Vermeulen, E. De Sousa, F. Melo [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 12(5). – P. 468-476.
172. Voutsadakis I.A. The ubiquitin–proteasome system and signal transduction pathways regulating Epithelial Mesenchymal transition of cancer / I.A. Voutsadakis // *Journal of Biomedical Science.* – 2012. – Vol. 19. – P. 67.
173. Wang C. Mitochondrial shuttling of CAP1 promotes actin- and cofilindependent apoptosis / C. Wang, G.L. Zhou, S. Vedantam [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2008. – Vol. 1(121). P. 2913-2920.
174. Wang L. Fbxw11 promotes the proliferation of lymphocytic leukemia cells through the concomitant activation of NF- κ B and β -catenin/TCF signaling pathways / L. Wang, W. Feng, X. Yang [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9(4). – P. 427.
175. Weeks S.D. Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6 / S.D. Weeks, E.V. Baranova, M. Heirbaut [et al.] // *J. Struct. Biol.* – 2014. – Vol. 185(3). – P. 342-354.
176. Wei R. Comparative proteomic and radiobiological analyses in human lung adenocarcinoma cells / R. Wei, Y. Zhang, L. Shen [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 2012. – Vol. 359(1-2). – P. 151-159.
177. Xiao M. Overexpression of MMSET in endometrial cancer: a clinicopathologic study / M. Xiao, S. Yang, J. Chen [et al.] // *J. Surg. Oncol.* – 2013. – Vol. 107(4). – P. 428-432.
178. Xie S.S. Overexpression of adenylate cyclase-associated protein 1 may predict brain metastasis in non-small cell lung cancer / S.S. Xie, M. Tan, H.Y. Lin [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 33(1). – P. 363-371.
179. Xu W. Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners / W. Xu, D. Kimelman // *J. Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 3337-3344.

180. Xu Z. Association between the hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility: a metaanalysis based on 22, 475 subjects / Z. Xu, L. Yu, X. Zhang. // *Diagnostic Pathology*. – 2013. – Vol. 8. – P. 144.
181. Xue B. Guardians of the actin monomer / B. Xue, R.C. Robinson // *Eur. J. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 92. P. 316-332.
182. Yadav A.K. Deletion analysis of BMI1 oncoprotein identifies its negative regulatory domain / A.K. Yadav, A.A. Sahasrabudhe, M. Dimri [et al.] // *Mol. Cancer*. – 2010. – Vol. 9. – P. 158.
183. Yadav L. Matrix metalloproteinases and cancer-roles in threat and therapy / Yadav L., Puri N., Rastogi V. [et al.] // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2014. – Vol. 15(3). – P. 1085-1091.
184. Yamazaki K. Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility / K. Yamazaki, M. Takamura, Y. Masugi [et al.] // *Lab. Invest.* – 2009. – Vol. 89. P. 425-432.
185. Yang X. Wnt signaling through Snail1 and Zeb1 regulates bone metastasis in lung cancer / X. Yang, L. Li, Q. Huang [et al.] // *Am. J. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 5(2). – P. 748-755.
186. Yoo Y. Tyrosine phosphorylation of cofilin at y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin-proteasome pathway / Y. Yoo, H.J. Ho, C. Wang [et al.] // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29(2). – P. 263-272.
187. Yu X.F. Knocking down the expression of adenylate cyclase-associated protein 1 inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells / X.F. Yu, Q.C. Ni, J.P. Chen [et al.] // *Exp. Mol. Pathol.* – 2014. – Vol. 96(2). –P. 188-194.
188. Zhang H. Mammalian adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) regulates cofilin function, the actin cytoskeleton, and cell adhesion / H. Zhang, P. Ghai, H. Wu [et al.] // *The J. of Boil. Chemistry*. – 2013. – Vol. 288(29). – P. 20966-20977.
189. Zhao W. Expression of Fascin-1 on human lung cancer and paracarcinoma tissue and its relation to clinicopathological characteristics in patients with lung cancer / W. Zhao, J. Gao, J. Wu [et al.] // *Onco Targets Ther.* – 2015. – Vol. 8. – P. 2571-2576.

190. Zheng Q. Long noncoding RNA MEG3 suppresses liver cancer cells growth through inhibiting β -catenin by activating PKM2 and inactivating PTEN / Q. Zheng, Z. Lin, J. Xu [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9(3). – P. 253.
191. Zheng Y. Neoadjuvant therapy in non-small cell lung cancer / Y. Zheng, M. T. Jaklitsch, R. Bueno // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* – 2016. – Vol. 25(3). – P. 567-584.
192. Zhonghua Y. Expression and diagnosis value of Fascin in non-small cell lung cancer patients / Y.G. Liu, X.D. Gao, W.T. Yue // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 2013. – Vol. 93(31). – P. 2505-2507.
193. Zhou G.L. Mammalian CAP (Cyclase-associated protein) in the world of cell migration / G.L. Zhou, H. Zhang, J. Field // *Cell Adhesion & Migration.* – 2014. – Vol. 8(1). P. 55-59.
194. Zhou G.L. Phosphorylation of the cytoskeletal protein CAP1 controls its association with cofilin and actin / G.L. Zhou, H. Zhang, H. Wu [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2014. – Vol. 127(23). – P. 5052-5065.
195. Zhu W.Y. Prognostic evaluation of CapG, gelsolin, P-gp, GSTP1, and Topo-II proteins in non-small cell lung cancer / Zhu W.Y. Hunag YY, Liu XG [et al.] // *Anat. Rec.* – 2012. – Vol. 295(2). – P. 208-214.